



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudios funcionales y moleculares sobre la regulación de la capacidad fertilizante del espermatozoide y la activación del ovocito

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Matías Daniel Gómez Elías

Directora de tesis: Dra. Débora Juana Cohen

Consejera de estudios: Dra. Valeria Levi

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2019

Estudios funcionales y moleculares sobre la regulación de la capacidad fertilizante del espermatozoide y la activación del ovocito

En mamíferos, la formación de un nuevo individuo diploide es el resultado de la fusión de dos células haploides mediante el proceso denominado “fertilización”. A su vez, la entrada del espermatozoide fertilizante gatilla en el ovocito la “activación ovocitaria”, que constituye una de las primeras etapas del desarrollo embrionario el cual culminará con la implantación uterina. El objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar aspectos funcionales y moleculares asociados al proceso de fertilización y a la activación ovocitaria utilizando dos aproximaciones experimentales distintas. En primer lugar, nos centramos en el estudio de moduladores moleculares de la activación ovocitaria y, en particular, de la translocación de fosfatidilserina (PS) en la membrana de ovocitos fertilizados de ratón y su relevancia para la activación del desarrollo. Los resultados mostraron que la exposición de PS no depende de la fusión de gametas, sino del aumento de calcio citoplasmático producido por el espermatozoide fertilizante o por la activación partenogenética. Observamos que la translocación de PS sólo ocurre luego de la entrada de calcio del medio extracelular y requiere la despolimerización de los filamentos de actina. Si bien este fenómeno no es consecuencia de la desorganización de la membrana producto de la exocitosis cortical, se evidenció que PS se expone mayoritariamente en los sitios de fusión de los gránulos corticales. En concordancia con este resultado, observamos por primera vez que luego de la exocitosis masiva de gránulos corticales se gatilla en el ovocito de ratón un mecanismo de endocitosis compensatoria y que este evento podría estar regulado por la exposición de PS. La segunda aproximación experimental se basó en el esclarecimiento del mecanismo de acción de un altamente efectivo anticonceptivo de emergencia, el acetato de ulipristal (UPA), más allá de su conocida acción antiovulatoria. Para ello, estudiamos si este regulador de la fertilidad presenta actividad inhibitoria sobre el proceso de fertilización y el desarrollo embrionario. Los resultados revelaron que UPA no altera la capacidad fertilizante del espermatozoide humano o murino ni el desarrollo del embrión de ratón. No obstante, la administración de UPA a hembras luego de ocurrida la fertilización y previa a la implantación previene la preñez debido a cambios en el endometrio que alteran su interacción con el embrión, develando un mecanismo adicional de este anticonceptivo que contribuiría a su alta efectividad. En conjunto, estos estudios proveen información novedosa asociada no sólo a los mecanismos de activación ovocitaria sino también a los mecanismos de acción de un anticonceptivo de emergencia ampliamente utilizado. Estos resultados podrían resultar fundamentales para el desarrollo de métodos de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad, así como también para el apropiado uso de los métodos anticonceptivos existentes.

Palabras clave: fertilización, activación ovocitaria, desarrollo embrionario, implantación, espermatozoide, ovocito, acetato de ulipristal, fosfatidilserina, endocitosis compensatoria

Functional and molecular studies on the regulation of sperm fertilizing ability and egg activation

In mammals, the formation of a new diploid individual is the result of the fusion of two haploid cells through the process called "fertilization". After fusion, the entry of the fertilizing sperm triggers in the egg a series of changes collectively referred to as "egg activation", one of the first steps of embryo development which will culminate with uterine implantation. The general objective of this Thesis has been to study functional and molecular aspects associated to the fertilization process and egg activation by employing two different experimental approaches. First, we focused on the study of molecular modulators of egg activation and, in particular, the translocation of phosphatidylserine (PS) in the membrane of fertilized mouse eggs and its relevance for activation of development. Results showed that the exposure of PS does not depend on gamete fusion itself, but on the increase of cytoplasmic calcium produced by the fertilizing sperm or by parthenogenetic activation. We observed that PS translocation only occurs after extracellular calcium influx and requires actin depolymerization. Although this phenomenon is not a consequence of the disorganization of the membrane produced by cortical exocytosis, we detected that external PS was mostly exposed in the fusion sites of the cortical granules. In accordance with this, we observed for the first time that fertilization as well as parthenogenetic activation triggers a compensatory endocytosis mechanism in mouse eggs after massive exocytosis of cortical granules, and that this event could be regulated by PS exposure. The second experimental approach focused on the elucidation of the mechanism of action of a highly effective emergency contraceptive, ulipristal acetate (UPA), beyond its well-known antioviulatory action. To do this, we studied whether this fertility regulator exerts inhibitory activity on the process of fertilization and embryo development. Results revealed that UPA does not alter the fertilizing ability of human or murine sperm or the mouse embryo development. However, administration of UPA to mouse females after fertilization and prior to implantation prevents pregnancy due to changes in the endometrium that alter its interaction with the embryo, revealing an additional mechanism of this contraceptive drug that would contribute to its high effectiveness. Altogether, these studies provide novel information associated not only with mechanisms of egg activation but also with mechanisms of action of a widely used emergency contraceptive. These results could be fundamental for the development of new methods of diagnosis and treatment of infertility, as well as for the appropriate use of existing contraceptive methods.

Keywords: fertilization, egg activation, embryo development, implantation, sperm, egg, ulipristal acetate, phosphatidylserine, compensatory endocytosis

AGRADECIMIENTOS

Estos últimos cinco años fueron una montaña rusa en casi todos los planos de mi vida, y llevar adelante esta Tesis no quedó afuera de esa sensación. Por eso mismo quiero agradecer a todas aquellas personas que me hicieron pasar los mejores momentos, así como a quienes me acompañaron en las situaciones difíciles, de frustración o de enojo. Hacer investigación es un reto diario y valoro enormemente lo positivo que fue tenerlos cerca para seguir adelante, más allá de los tropezones con los que nos hayamos enfrentado. En particular, quiero agradecer...

A Deb, mi directora, que a lo largo de estos años me enseñó casi todo lo que sé y puse en práctica para realizar mi doctorado, y que me ayudó a tolerar la frustración y la impaciencia con una mirada positiva y perseverante; que me permitió muchas veces explorar nuevos rumbos confiando en que lo podíamos sacar adelante; que siempre estuvo presente cuando la necesité y con quien, a mi parecer, hicimos un gran equipo.

A Paty, que me abrió las puertas de su laboratorio, y no sólo contribuyó a mi formación y a mi doctorado, sino que diariamente nos transmite su amor por el mundo de la fertilización.

A los miembros presentes y pasados del Laboratorio de Mecanismos Moleculares de la Fertilización, que profesional y emocionalmente brindaron su apoyo cada día. A Vani, Marian, Agus, Nico B., Guille, Ludmi, Estefi, Mili, Tom, Nico V., Sol y Gala. Gracias por compartir sus conocimientos (del tema y misceláneos), su tiempo de trabajo y de ocio, las alegrías y las tristezas. Uno muchas veces no puede elegir la gente con la que trabaja, pero estoy realmente agradecido por la gente que la vida puso en mi camino.

A mis amigos y amigas del IBYME, que afortunadamente no son pocos por lo que no podría nombrarlos a todos, y con quienes he compartido mil historias. Ustedes son los pilares fundamentales en las peores crisis de la vida del becario. Gracias al grupo de las "juntadas", a las chicas del Laboratorio Buffone, a los compañeros de pasillo, a la gente del Coro, y a todos los becarios con los que compartimos tanto reuniones científicas como festejos. Gracias Guille, Naty, Mara y Feli por ser personas tan increíbles y por todo el amor que recibo de ustedes.

Al IBYME y todos sus integrantes, porque cada uno contribuyó directa o indirectamente para que mi doctorado saliera adelante y para hacer mi paso por este Instituto una experiencia inolvidable.

Al CONICET, la Agencia y la Fundación Roemmers, que financiaron mi doctorado y mi trabajo de investigación. A la Fundación Fulbright, que me permitió vivir una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida, tanto profesional como personalmente.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) que me formó como químico, pero más aún como profesional, haciendo posible que me embarcara en un área tan misteriosa como era para mí la Biología. Gracias a todos los profesores y compañeros con quienes crecí tanto durante mis estudios de grado y, en particular, a Olga, mentora y amiga en momentos decisivos; y gracias a quienes me cruzó la vida durante el doctorado. A mi consejera de estudios, Valeria Levi, y al resto de mi Comité de Seguimiento, conformado por Silvina Pérez Martínez y Marcela Michaut, quienes dieron su aporte y apoyo para la realización de esta Tesis.

A Rafael Fissore, que no sólo representó un exponente en el área de la fisiología ovocitaria y con quien compartir resultados era motivador, sino que es un excelente ser humano que me abrió las

puertas tanto de su laboratorio como de su casa. Gracias a los miembros de su laboratorio, ChangLi, Goli y Aujan, que me enseñaron, entre otras cosas, técnicas tan complejas como la microinyección de ovocitos. Gracias a los integrantes del laboratorio de Pablo Visconti y a todos los amigos que me hice en Amherst. Me hicieron pasar una experiencia maravillosa.

A todos los que contribuyeron directamente sobre mis experimentos. A cada miembro (pasado y presente) del Journal Club de gametas, que nos permitió ampliar el espectro de nuestro área de conocimiento entre mucho, mucho dulce. A María José Munuce y Luis Bahamondes, quienes propiciaron emprender la travesía de UPA en el proceso reproductivo. A Pablo Pomata, por las infinitas horas compartidas en el confocal, que devinieron en múltiples y diversas charlas. A Mercedes Goin, fundamental para el diseño de mis plásmidos, quien me ayudó y aconsejó para que, entre tanta enzima de restricción, existiera un camino para lograr el objetivo. A Naty del Bioterio, que, con paciencia, me enseñó a hacer las inyecciones intravenosas en la cola de mis ratonas. A Augusto, de quien heredé varios protocolos con ovocitos, novedosos para el laboratorio.

Al Colegio Nacional de Buenos Aires y, particularmente, al Departamento de Química, que me permitieron seguir unido a la docencia y a la química durante este doctorado.

A mis amigos del Secundario y que hoy son incondicionales amigos de la vida, Pipi, Fran, Agus, Caro y Palo. Los amo y, aunque no estuvieran directamente involucrados en mi Tesis, me hacen escapar a otras realidades y logran que diariamente mi vida sea más feliz y divertida.

A los Bebos, Fer, Santi, Pato, Noe, DeeDee y Vicky, por todo lo que me han hecho reír desde que los conozco, por su compañía, apoyo, y las famosas escapadas que consolidaron nuestra amistad.

A las gallinitas, Agus, Esteban, La Mos, Tomasito, Fer, Juan, Brian, Pablo, Jota, Lean, La Bolocco, que me enseñaron a ver la vida de una manera más relajada pero sin paz, donde los twists son moneda corriente y uno no puede descuidarse porque lo pasan por encima (y por varios puntos). Gracias a RuPaul que nos unió y nos entretiene cada semana, incluyendo sabios consejos de cómo amarnos a nosotros mismos.

A tres amigas que estuvieron presentes incondicionalmente a lo largo de todos estos años. A Nati, que me enseñó a atravesar los malos momentos (suyos o míos) con actividad física, amigos y buena gastronomía. A Pao, una de las mejores personas que me dejó la Facultad, por quererme y acompañarme tanto. A Gi, mi hermana espiritual y consejera, quien me demuestra que hace falta más que distancia física para cortar los hilos que nos unen.

A todos aquellos que antaño han sido parte de mi vida y mi historia, moldeando mi carácter y ayudando a descubrirme cada día. En particular, a Lucas, que me acompañó en las buenas y en las malas en los años más intensos de mi doctorado.

A Agus, que me hizo sonreír en el momento de la escritura de esta Tesis y con quien vivir cada momento intensamente parece la mejor forma de recorrer la vida.

A mi familia entera, que siempre me apoyó y empujó a ser ambicioso con mi formación y conocimiento. A mis abuelas, que las amo por darnos todo sin esperar nada. A mis hermanos, Ceci y Santi, que toda mi vida fueron compañeros de aventuras y con quienes afortunadamente tengo mucho más para compartir. Gracias por bancarme y quererme como soy, y gracias Ceci por ese sobrino hermoso que me diste. A mis papás, que me dieron literalmente la vida y todo lo que estuvo a su alcance para que yo pudiera ser feliz, y por amarme como soy.

*"El viaje no termina jamás. Solo los viajeros terminan.
Y también ellos pueden subsistir en memoria, en recuerdo, en narración...
El objetivo de un viaje es sólo el inicio de otro viaje."*

José Saramago

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Introducción.....	11
El ovocito, la gameta femenina	12
El espermatozoide, la gameta masculina	18
El proceso de fertilización	25
Activación del ovocito	29
Desarrollo embrionario preimplantatorio	39
Fisiología uterina e implantación	41
Objetivos.....	44
Materiales y métodos.....	48
1. Animales.....	49
2. Obtención y capacitación de espermatozoides murinos	49
3. Evaluación del número y la viabilidad de los espermatozoides	50
4. Superovulación de las hembras y obtención de ovocitos maduros	50
5. Obtención de ovocitos inmaduros de ratón.....	51
6. Evaluación del ciclo estral de las hembras	51
7. Obtención de ovocitos de ratón fertilizados <i>in vivo</i>	52
8. Activación partenogenética de los ovocitos de ratón	52
9. Marcación de fosfatidilserina (PS) externalizada y ADN en ovocitos	52
10. Detección del contenido y el exudado de gránulos corticales (GC)	53
11. Marcación de F-actina en ovocitos	53
12. Ensayos de pulso y caza	54
13. Captura y análisis de imágenes	55
14. Medición de calcio en ovocitos de ratón	55
15. Subclonado de <i>Plscr1</i>	56
16. Análisis de la presencia de <i>Plscr1</i> en plásmidos	57
a. Extracción de ADN bacteriano.....	57
b. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	58
17. Obtención de ARN.....	58
18. Microinyección de ARN en ovocitos de ratón	59
19. Análisis de la expresión de <i>Tmem16f</i> en ovocitos.....	60
a. Extracción de ARN	60

b. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	60
20. Obtención y capacitación de espermatozoides humanos.....	61
21. Ensayos de interacción de gametas con espermatozoides humanos	61
a. Ensayo de penetración del cúmulus de ratón	61
b. Ensayo de penetración de ovocitos de hámster (HOPT, <i>hamster oocyte penetration test</i>).....	62
22. Evaluación de la reacción acrosomal de espermatozoides murinos	62
23. Ensayos de interacción de gametas con espermatozoides murinos	63
24. Desarrollo embrionario de ovocitos fertilizados <i>in vivo</i>	63
25. Ensayos <i>in vivo</i> con UPA.....	63
a. Preparación de UPA.....	63
b. Efecto de UPA sobre la ovulación	64
c. Efecto de UPA sobre la fertilización <i>in vivo</i>	64
d. Efecto de UPA sobre eventos post-fertilización	64
i. Evaluación de la preñez	64
ii. Detección de sitios de implantación tempranos	65
iii. Obtención de embriones preimplantatorios	65
iv. Procesamiento histológico de los cuernos uterinos	65
v. Inducción de la decidualización artificial	66
26. Análisis estadístico	66
Capítulo I	68
Introducción	69
Hipótesis.....	76
Resultados	77
Discusión	108
Capítulo II	127
Introducción	128
Hipótesis.....	134
Resultados	135
Discusión	151
Discusión general y palabras finales	160
Referencias	164

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio citoplasmático
2-APB	2-aminoetoxidifenilborato
AE	Anticonceptivo de emergencia
ANOVA	Análisis de la varianza
ANX5-FITC	Anexina V fluoresceinada
APC	Complejo Promotor de la Anafase
BSA	Albúmina sérica bovina
BWW	Medio Biggers, Whitten, Whittingham
CaM	Calmodulina
CAMKII	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
CGP	Células germinales primordiales
COC	Complejo ovocito-cúmulus
CsA	Ciclosporina A
CytD	Citocalasina D
CZB	Medio Chatot, Ziomek y Bavister
DAG	Diacilglicerol
EC	Endocitosis compensatoria
F-actina	Actina filamentosa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fura-2AM	Fura-2 acetoximetiléster
G-actina	Actina monomérica globular
GC	Gránulos corticales
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HOPT	Ensayo de penetración de ovocitos de hámster
IBMX	Isobutil-1-metilxantina

ICSI	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
Jas	Jasplakinolide
LatA	Latrunculina A
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin
LNG	Levonorgestrel
MARCKS	Sustratos de PKC ricos en alanina miristoilada
MCI	Macizo celular interno
MII	Metafase II
MPF	Factor Promotor de la Maduración
Mut	Mutante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKC	Proteína quinasa C
PMSG	Gonadotrofina coriónica equina
PS	Fosfatidilserina
PVA	Polivinilalcohol
ROI	Región de interés
SFB	Suero Fetal Bovino
Stp	Staurosporina
TRITC	Tetrametilrodamina
UPA	Acetato de ulipristal
WT	Salvaje
ZP	Zona pelúcida

Introducción

En mamíferos, la formación de un nuevo individuo requiere de una secuencia ordenada y precisa de eventos. Éstos incluyen la formación de las gametas en los progenitores y su transporte en los tractos reproductivos; la interacción de un espermatozoide con un ovocito para dar un embrión con ADN de ambos padres; y el desarrollo de este embrión y su interacción con el útero materno en el proceso de implantación. Tras el establecimiento del embarazo ocurrirá la gestación de este individuo y finalmente su nacimiento.

Esta Tesis se centrará en el estudio de aspectos funcionales y moleculares del proceso reproductivo que aún no han sido abordados. A continuación, y a modo de Introducción, se describen brevemente las principales características y mecanismos de los eventos que van desde la formación de las gametas hasta el establecimiento del embarazo.

El ovocito, la gameta femenina

El proceso por el cual se produce la gameta femenina u ovocito se denomina ovogénesis y comienza por la formación de las células germinales primordiales (CGP) en el embrión y culmina para cada ovocito con su liberación durante la ovulación, lo cual ocurre en forma cíclica y repetida durante la vida adulta hasta la menopausia (Machaty et al., 2017).

Tanto la ovogénesis como el proceso de fertilización y el desarrollo del nuevo individuo ocurren dentro del tracto reproductor femenino formado por los ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina (Fig. 1A). Los ovarios son estructuras anatómicas pares adosadas a la pared posterior de la cavidad abdominal, los cuales contienen una zona periférica o corteza con las estructuras foliculares que contienen a los ovocitos, y una zona central o médula, formada por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos (Fig. 1B). Estos órganos están en contacto directo con los oviductos, conocidos en el humano como Trompas de Falopio y que en su extremo contienen fimbrias que permiten la captación del ovocito ovulado. En tanto que en la región del oviducto más proximal al ovario, denominada *ampulla*, se produce la interacción de las gametas, la región distal, el *isthmus*, actúa como reservorio de espermatozoides (Fig. 1A). El útero es el lugar donde se implanta y desarrolla el embrión y, a diferencia de lo que ocurre en primates (Fig. 1A), es bicornio en la mayoría

de los mamíferos. El mismo se conecta a través del cuello del útero o cérvix a la vagina, que constituye el órgano del tracto femenino en contacto con el exterior (Fig. 1A).

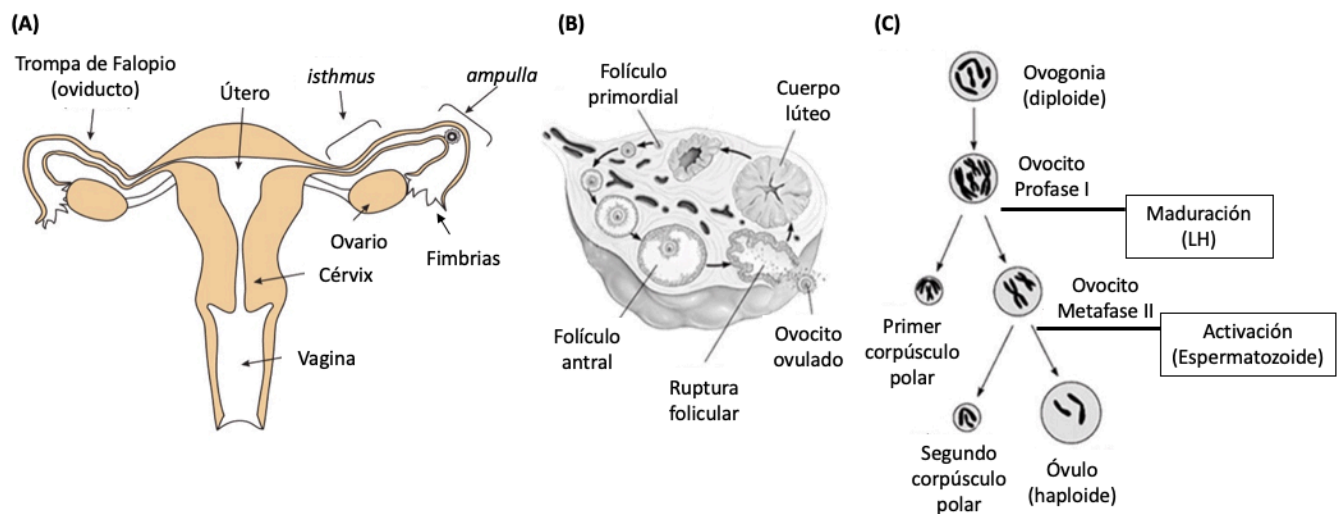


Figura 1. La ovogénesis y el tracto reproductor femenino. (A) Representación simple del tracto reproductor femenino humano (Adaptado de Darszon et al., 2011). (B) Esquema de un corte transversal de ovario, resaltando algunos estadios foliculares presentes durante la ovogénesis. (C) Etapas de la meiosis femenina.

Todas las gametas, tanto femeninas como masculinas, se originan a partir de un escaso número de células pluripotenciales de origen extragonadal, las CGP, que migran a la gónada primitiva durante los primeros estadios de la embriogénesis (Machaty et al., 2017). En la hembra, una vez diferenciado el ovario, las CGP se diferencian dando origen a las ovogonias, las cuales inicialmente aumentan en número por sucesivas divisiones mitóticas, y luego darán lugar a los ovocitos producto de su división meiótica. Durante su formación, estos ovocitos tendrán dos arrestos meióticos en distintas etapas y la compleción de la meiosis sólo ocurrirá en caso de que el ovocito sea fertilizado (Fig. 1C), tal como se describirá más adelante. Durante la vida fetal en la mayoría de los mamíferos, todas las ovogonias entran en meiosis en forma simultánea. Es por este motivo que la hembra puede producir un número limitado de ovocitos durante la vida adulta. Durante la primera división meiótica, los ovocitos se arrestan en el estadio diplotene de la Profase I, caracterizado por altos niveles de AMP cíclico y una baja actividad del Factor Promotor de la Maduración (MPF) (Mehlmann, 2005). En este estadio, los ovocitos contienen un núcleo de gran tamaño denominado vesícula germinal que se encuentra en posición central.

Los ovocitos en Profase I se encuentran en las gónadas en desarrollo rodeados por una única capa de células somáticas, llamadas células de la pregranulosa, formando una estructura denominada folículo primordial (Fig. 1B). Los folículos son las unidades estructurales y funcionales del ovario que les proveen a las células germinales un ambiente adecuado para facilitar su crecimiento y la acumulación de nutrientes en el citoplasma. Esto se logra a través de una red de uniones “*gap*” que facilita la transferencia de señales y nutrientes entre las células foliculares y de las mismas con el ovocito (Fair, 2003).

En una primera instancia, los ovocitos en Profase I experimentan una etapa de crecimiento. Durante la misma, presentan alta tasa metabólica, transcripcional y traduccional, y aumentan su volumen, debido a la acumulación de organelas celulares y gotas lipídicas en el citoplasma (Machaty et al., 2017). Asimismo, la membrana plasmática u oolema adquiere microvellosidades en toda la superficie y, producto de la expansión del aparato de Golgi, se forman los gránulos corticales (GC), vesículas secretorias que en el ovocito maduro participan en el bloqueo de la polispermia luego de la fertilización (Ducibella et al., 1994) (ver “Activación del ovocito”). Hacia el final de la etapa de crecimiento, alrededor del ovocito se forma la zona pelúcida (ZP) (Philpott et al., 1987; Roller et al., 1989), una matriz glicoproteica cuyos componentes son sintetizados, procesados y secretados por el mismo ovocito (Wassarman, 1988). Concomitante con el crecimiento ovocitario, comienza el desarrollo del folículo durante el cual las células de la granulosa cambian de forma plana a cuboide (formación del folículo primario) y luego proliferan creando una estructura con varias capas de células (folículo secundario). Luego de la pubertad, el aumento de los niveles de hormona folículo estimulante (FSH) induce el desarrollo de los folículos secundarios a antrales, con la aparición de una cavidad llena de líquido denominada antro y de receptores para hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa. Con la formación del antro, el ovocito, junto con un grupo de células de la granulosa conocidas como células del cúmulus, que lo acompañarán durante la ovulación, toma una posición excéntrica en el folículo (Fig. 1B). Finalmente, el aumento de los niveles de LH gatilla la maduración ovocitaria con reasunción de la meiosis y la ruptura folicular con la liberación del ovocito maduro (Fig. 1B y 1C). Luego de la ovulación, el folículo remanente forma el cuerpo lúteo, una glándula endócrina transitoria cuya principal función

es la producción y secreción de progesterona importante para el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Patel et al., 2015).

Durante la maduración ovocitaria gatillada por la LH ocurren cambios en el ovocito que lo prepararán para activarse y completar la meiosis luego de su fusión con el espermatozoide, e iniciar el subsecuente desarrollo embrionario. Estos cambios ocurren tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Loutradis et al., 2006; Ferreira et al., 2009). La maduración nuclear comprende la ruptura de la vesícula germinal, la condensación y segregación cromosomal, la extrusión del primer corpúsculo polar y el arresto en Metafase II (MII). La maduración citoplasmática, por otro lado, está menos caracterizada pero incluye la reorganización de organelas, un aumento del contenido de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares, un aumento de compuestos antioxidantes y el almacenamiento de ARNm maternos y proteínas que serán funcionales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Guérin et al., 2001; Ferreira et al., 2009).

La reasunción de la meiosis durante la maduración resulta en la división asimétrica del citoplasma de la gameta femenina. De esta forma se origina, por un lado, el ovocito maduro arrestado en MII, conteniendo la mayor parte del citoplasma y que posee la capacidad de originar un embrión luego de la fertilización, mientras que la otra célula, conocida como el primer corpúsculo polar, recibe una cantidad mínima de citoplasma y está destinada a la apoptosis (Fig. 1C). Durante la maduración, el citoesqueleto de actina sufre una reorganización que provoca la polarización necesaria tanto para esta división asimétrica como para la relocalización de las organelas (Sun y Schatten, 2006) (Fig. 2). El huso meiótico se forma en el centro del ovocito inmaduro y luego migra a la periferia dirigido por microfilamentos, por donde se extrude el primer corpúsculo polar. Asimismo aumenta la densidad de actina citoplasmática y ocurre el engrosamiento de la capa de actina cortical en todo el ovocito (Longo, 1987; Chaigne et al., 2013, 2015), siendo más densa en la zona que recubre el huso meiótico (Maro et al., 1986). En roedores, además, se evidencia la formación de un área carente de microvellosidades en la región del oolema que recubre el huso meiótico (Longo y Chen, 1984). A su vez, en la región cortical por debajo de las microvellosidades se concentran los GC (Liu, 2011) (Fig. 2) y se producen agregados de retículo endoplasmático (Mehlmann et al., 1995; FitzHarris et al., 2003). Durante la maduración el retículo endoplasmático acumula iones Ca^{2+} , actuando como reservorio

intracelular de este catión, el cual tendrá un rol fundamental en la activación (Cheon et al., 2013) (ver “Activación del ovocito”). Por otro lado, se ha visto que las mitocondrias, que en el ovocito inmaduro son alrededor de 10000 agregadas alrededor de la vesícula germinal, se dispersan en el citoplasma (Yu et al., 2010), ocupando aproximadamente el 30% del volumen del ovocito maduro (Dumollard et al., 2006).

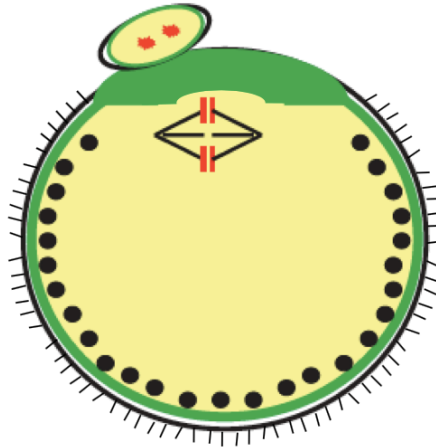


Figura 2. Polarización del ovocito murino durante la maduración. El huso meiótico se localiza en forma periférica bajo una gruesa capa de actina (verde) por donde se emite el primer corpúsculo polar. Los GC (negro), por otro lado, se ubican en la región cortical por debajo de la zona con microvellosidades, esquematizadas en el oolema (Adaptado de Sun y Schatten, 2006).

Por su parte, en el resto del folículo, por acción de la LH, ocurre la expansión del cúmulus (Zhuo y Kimata, 2001). Durante este proceso, las células del cúmulus que rodean al ovocito sintetizan y secretan grandes cantidades de glicosaminoglicanos, principalmente ácido hialurónico, formando una matriz extracelular viscoelástica denominada *cumulus oophorus*. Adicionalmente, ocurre la disrupción física de las uniones “gap” que comunicaban a las células del cúmulus entre sí y con el ovocito.

En cada ciclo estral, un cierto número de ovocitos, dependiendo de la especie, es capaz de ser ovulado. En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en el estadio de MII, con el primer corpúsculo polar emitido. La compleción de la meiosis se dará únicamente luego de la entrada de un espermatozoide, durante la activación ovocitaria, con la extrusión del segundo corpúsculo polar (Fig. 1C). Si por el contrario no ocurre la fertilización, este ovocito se degenerará sin haber completado la meiosis.

El ovocito maduro de mamíferos es una célula esférica, de diámetro variable según la especie (70-120 μm), rodeado por la ZP y embebido en el *cumulus oophorus*. Entre la ZP

y la membrana plasmática del ovocito se encuentra el espacio perivitelino. En conjunto, al complejo formado por todas estas estructuras se lo denomina complejo ovocito-cúmulus (COC). En la Figura 3 se observan microfotografías correspondientes a ovocitos antes y después de la maduración, junto con algunas de las estructuras previamente descriptas.

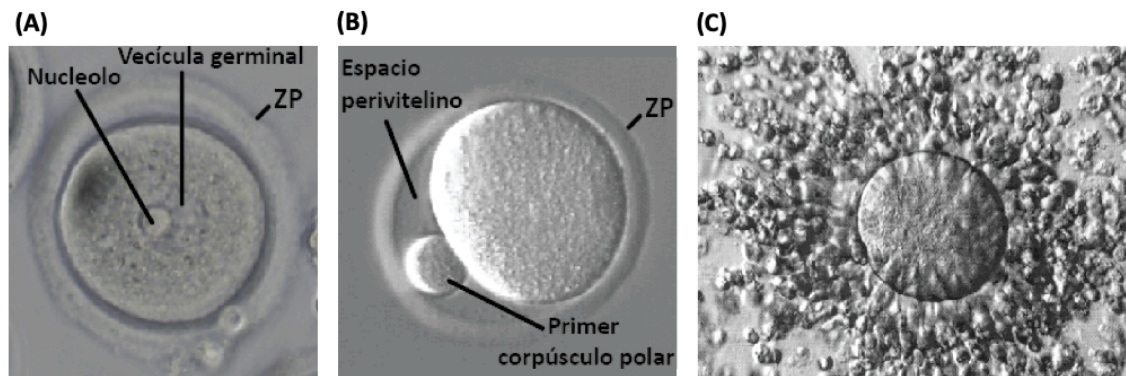


Figura 3. La gameta femenina. (A) Microfotografía de un ovocito inmaduro de ratón denudado de células del cúmulus, en la que se observa la vesícula germinal y un nucléolo prominente. (B) Microfotografía de un ovocito maduro de ratón arrestado en MII sin células del cúmulus. Nótese el espacio perivitelino y el primer corpúsculo polar. (C) Microfotografía de un COC de ratón luego de la ovulación. ZP: Zona pelúcida.

Las estructuras que rodean al ovocito cumplen distintas funciones. La ZP está compuesta principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias según la especie (Wassarman, 1988; Lefièvre et al., 2004), siendo ZP1, ZP2 y ZP3 las presentes en el ratón y cuyas funciones durante la fertilización y desarrollo han sido ampliamente estudiadas (Wassarman, 1988; Wassarman y Litscher, 2001; Hoodbhoy y Dean, 2004). La ZP sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia y proteger al ovocito y al embrión de daños físicos. Esto es especialmente importante durante el clivaje, donde la ZP evita la separación de las blastómeras y asegura la individualidad. Se ha reportado, por otra parte, que el espacio perivitelino podría jugar un rol en el proceso de fertilización y el bloqueo de la polispermia por mecanismos aún no del todo conocidos (Liu, 2011; Jankovičová et al., 2015). Finalmente, el cúmulus tendría funciones durante la ovulación y la fertilización (Yokoo y Sato, 2004; Salustri et al., 2018). Al proveerle un gran tamaño al COC, permitiría una eficaz extrusión del ovario y su captura por parte de las fimbrias oviductales. Asimismo, las células del cúmulus secretan continuamente progesterona (Teves et al., 2006) y otros factores que tendrían propiedades

quimioattractantes sobre los espermatozoides (Sun et al., 2005; Ernesto et al., 2015), pudiendo guiarlos hacia el ovocito.

El espermatozoide, la gameta masculina

El espermatozoide se produce en los testículos como consecuencia de la espermatogénesis (Austin, 1972). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las CGP durante la vida embrionaria, y requiere de la división meiótica para la producción de las gametas haploides. Sin embargo, mientras que en la hembra todas las ovogonias se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario y fetal y, por lo tanto, constituyen un número finito al principio de la vida fértil, en el macho existe a partir de la pubertad una población de células germinales denominadas espermatogonias capaces de multiplicarse por mitosis, permitiendo una producción ilimitada de espermatozoides en la vida adulta.

Los testículos (Fig. 4A) son órganos pares rodeados por la túnica albugínea que consisten en una serie de lóbulos conteniendo los túbulos seminíferos separados por tejido intersticial (Fig. 4B). Dentro de los túbulos seminíferos, además de la línea germinal, se encuentran las células de Sertoli cuya principal función es generar y mantener un microambiente apropiado para el correcto desarrollo de los espermatozoides. Las células de Sertoli se extienden desde la membrana o lámina basal del túbulo hasta el lumen del epitelio seminífero, formando uniones estrechas entre sí. Esto da lugar a la formación de la barrera hemato-testicular, que permite que las células germinales se encuentren aisladas del sistema inmune. Los túbulos seminíferos se unen entre sí en la *rete testis* que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo, órgano donde ocurre la maduración y almacenamiento de espermatozoides maduros (Fig. 4A y 4B). Durante la eyaculación, los espermatozoides atraviesan el *vas deferens*, que recoge además las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales), y finalmente la uretra (Fig. 4A).

Durante la espermatogénesis, en tanto que una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis, algunas espermatogonias se diferencian en espermatocitos primarios, los cuales generan espermatocitos secundarios por división meiótica (Fig. 4C). Éstos entran a una interfase intermeiótica de poca duración para pasar

luego a la segunda división meiótica que da origen a las células haploides llamadas espermátides. En una etapa posterior, estas células redondas se diferencian morfológicamente para producir espermatozoides a través del proceso de espermiogénesis (Fig. 4C), caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear (por reemplazo de histonas por protaminas), y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta. Como consecuencia de la pérdida casi completa del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, la síntesis y degradación de lípidos, y el transporte vesicular. Finalmente, se produce la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por un proceso de espermiación.

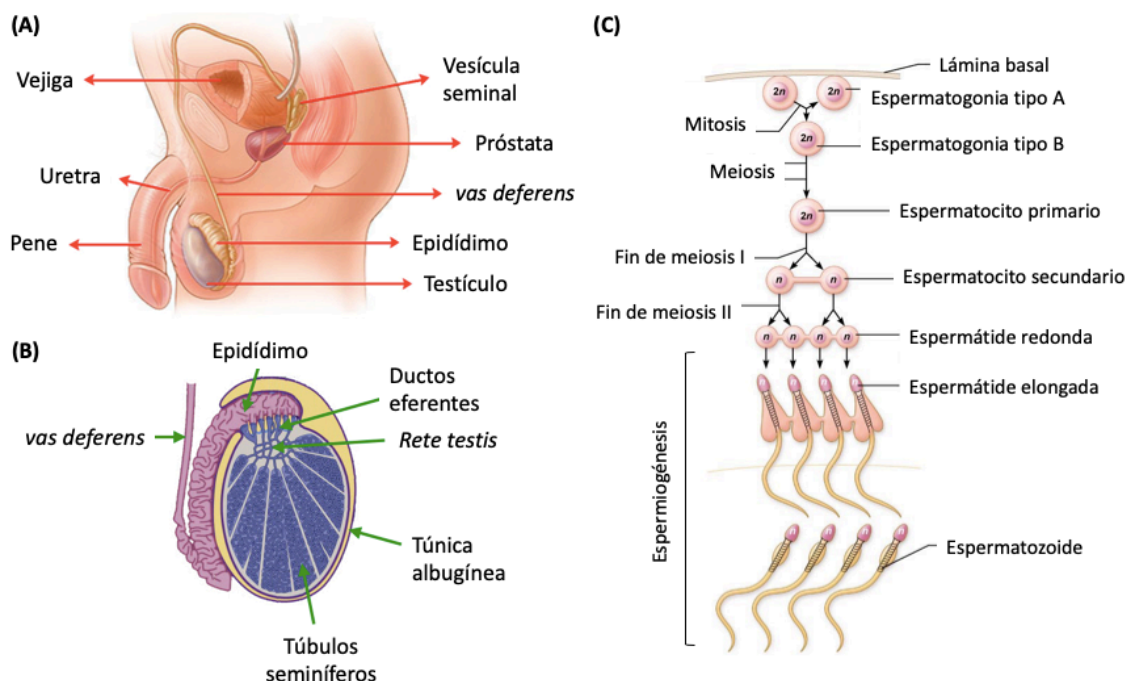


Figura 4. Tracto reproductor masculino y espermatogénesis. (A) Representación de un corte transversal de testículo. (B) Representación simple del tracto reproductor masculino. (C) Diagrama resumiendo las etapas de la espermatogénesis.

El espermatozoide es una célula altamente especializada y presenta motilidad propia, necesaria para su transporte hasta el sitio de fertilización en el tracto femenino donde finalmente se fusionará con el ovocito. Si bien la forma y el tamaño de los espermatozoides son dependientes de cada especie, la estructura general es similar en los mamíferos. Morfológicamente el espermatozoide posee dos componentes distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (Eddy y O'Brien, 1994; Darszon et al., 2011) (Fig. 5A).

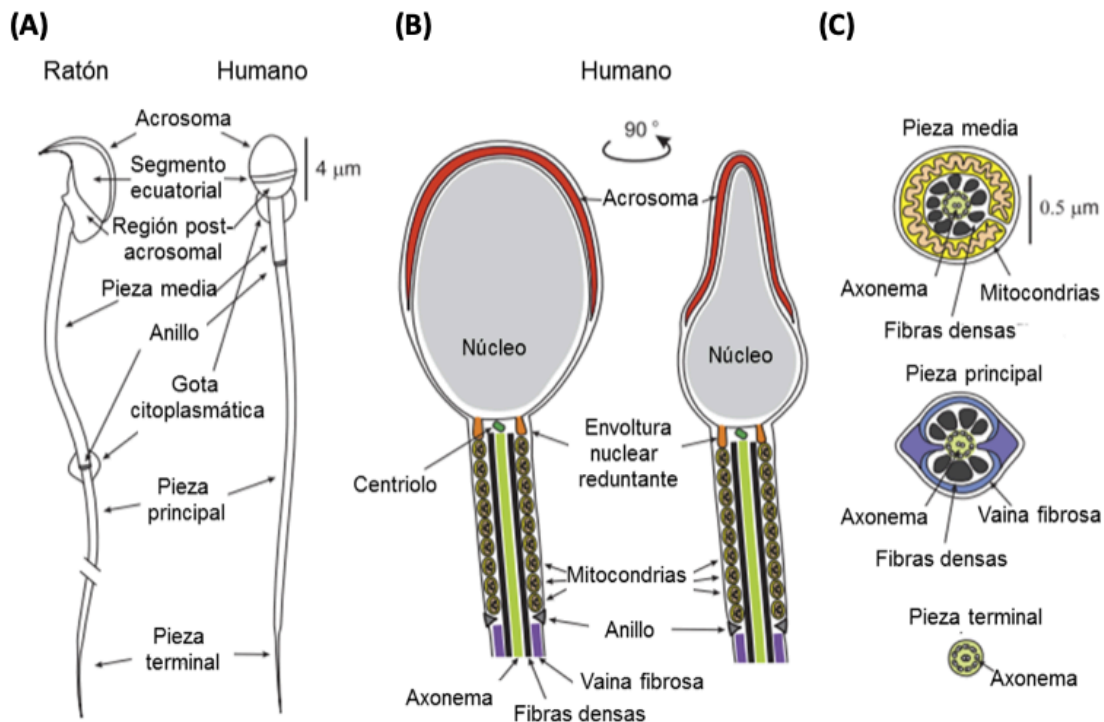


Figura 5. La gameta masculina. (A) Esquema de un espermatozoide de ratón y de humano en el que se muestran las diferentes estructuras. Nótese las diferentes formas de la cabeza (falciforme y espatulada, respectivamente). (B) Estructuras generales de la cabeza y pieza media de un espermatozoide humano visto de dos ángulos distintos. (C) Cortes transversales del flagelo en las diferentes secciones. (Adaptado de Darszon et al., 2011).

La cabeza del espermatozoide contiene, por un lado, un núcleo compacto debido a la presencia de cromatina altamente condensada y, por otro, el acrosoma, vesícula con roles durante la fertilización (Eddy y O'Brien, 1994). En el núcleo espermático, y a diferencia de otros tipos celulares, el ADN se encuentra principalmente asociado a protaminas, proteínas básicas de bajo peso molecular que permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina en comparación con las histonas presentes en las células somáticas (Ando et al., 1973). Por su parte, el acrosoma es una estructura membranosa originada en el aparato de Golgi que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, y está constituido por dos regiones denominadas capuchón acrosomal y segmento ecuatorial. En cuanto a su composición, el acrosoma contiene diversas moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización (Toshimori y Eddy, 2015). Si bien por su estructura y contenido el acrosoma se ha descrito como un lisosoma especializado, esta organela tendría, además, algunas características de una vesícula de secreción ya que libera sus

contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales propias y externas durante la interacción del espermatozoide con el tracto femenino y el ovocito (Stival et al., 2016). Cabe destacar que la forma de la cabeza del espermatozoide es dependiente de cada especie. Mientras que en el hombre y gran parte de los animales domésticos tiene una morfología espatulada (Fig. 5A y 5B), en la mayoría de los roedores, es falciforme con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo (Fig. 5A).

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesta por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Fig. 5A y 5C) (Eddy y O'Brien, 1994; Darszon et al., 2011). El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en una estructura de "9+2", con 9 pares de microtúbulos periféricos y 1 par central. Rodeando al axonema desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas en forma helicoidal que cumplirían un papel en la provisión de energía (Fig. 5B y 5C). En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, que sería importante para modular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural (Fig. 5C).

A pesar de que los espermatozoides liberados de los testículos son células altamente diferenciadas, en los mamíferos no tienen aún la capacidad de moverse progresivamente o de interactuar con el ovocito. Para adquirir estas capacidades y llegar al sitio de fertilización en estado competente, los espermatozoides deben sufrir numerosas modificaciones post-testiculares durante su pasaje tanto por el tracto masculino como por el femenino, que en conjunto se denominan maduración y capacitación espermática, respectivamente (Yanagimachi, 1994).

La maduración espermática ocurre en el epidídimo, un conducto único con muchas circunvoluciones que cubre el borde posterior del testículo (Fig. 4A y 4B). Si bien no existen límites anatómicos definidos, este órgano se divide convencionalmente en tres regiones:

caput o cabeza (región más próxima al testículo), *corpus* o cuerpo (región media) y *cauda* o cola (región distal al testículo). Durante su tránsito por estas regiones, los espermatozoides adquieren la motilidad progresiva y la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito como producto de una serie de cambios funcionales, estructurales y bioquímicos que surgen como consecuencia de la adquisición de nuevos componentes en la membrana y de la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la misma (Bedford, 1979; Hinrichsen y Blaquier, 1980; Austin, 1985; Eddy y O'Brien, 1994; Cooper, 1998). Asimismo, el epidídimo juega un rol fundamental en el transporte, la protección y el almacenamiento de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

Los espermatozoides son almacenados en la región del *cauda* epididimario hasta la eyaculación, durante la cual se liberan junto con las secreciones de las glándulas accesorias, formando así el plasma seminal. El plasma seminal suele ser ligeramente alcalino y contiene sustratos gelificantes tales como el fibrinógeno o semenogelina que coagulan temporalmente el semen, evitando la expulsión vaginal de los espermatozoides y protegiéndolos del bajo pH vaginal. Tras pasar unos minutos, por acción de la fibrinolisis, se produce la licuefacción del semen, permitiendo la liberación de los espermatozoides. En algunas especies como el ratón, y como producto de la acción de proteínas secretadas de vesículas seminales (SVS), se forma un tapón vaginal que resulta fundamental para la supervivencia de los espermatozoides en el útero (Kawano et al., 2014).

En la mayoría de las especies (como humanos, bovinos, caninos, felinos, caprinos) el sitio de deposición del semen es la vagina, mientras en que otras, la deposición ocurre en el cérvix (porcinos) o directamente en el útero (como equinos y muchos roedores) (Coy et al., 2012). Una vez depositados, los espermatozoides se transportan rápidamente por la cavidad uterina. Los espermatozoides murinos, por ejemplo, pueden alcanzar el oviducto dentro de los 30 minutos luego del apareo (Zamboni, 1972). Adicionalmente, numerosas evidencias indican que los movimientos peristálticos del útero favorecen la llegada de los espermatozoides al oviducto tanto en las especies con deposición vaginal como en las de deposición uterina (Suarez y Pacey, 2006). Se ha propuesto que estas contracciones podrían ser estimuladas tanto por los espermatozoides como por los componentes del plasma seminal (Peitz y Olds-Clarke, 1986; Crane y Martin, 1991).

Sólo una pequeña proporción de los espermatozoides eyaculados logra alcanzar el oviducto. En este sentido, cada vez son más las evidencias que apoyan la hipótesis de que el tracto reproductor femenino tiene mecanismos de selección altamente sofisticados que permiten únicamente la llegada de espermatozoides de alta calidad al sitio de fertilización (Holt y Fazeli, 2015; Sakkas et al., 2015; Suarez, 2016). En particular, se sugiere que el paso limitante para la mayoría de los espermatozoides es el tránsito a través de la unión utero-tubaria (Coy et al., 2012) (Fig. 6A), considerando el hecho de que ratones mutantes que producen espermatozoides con deficiencias para atravesar esta barrera son infértiles (Okabe, 2015). Si bien aún no se conocen en profundidad los mecanismos de selección existentes a nivel del tránsito por la unión utero-tubaria, se cree que la morfología, el tipo de motilidad y las marcas bioquímicas en la superficie espermática contribuyen al pasaje de los espermatozoides al oviducto (Holt y Fazeli, 2015; Sakkas et al., 2015; Suarez, 2016). El *isthmus* oviductal actúa como un reservorio de espermatozoides, los cuales interactúan directamente con el epitelio del oviducto hasta el momento de la ovulación. Una vez que el ovocito ha sido ovulado y se encuentra en la *ampulla*, los espermatozoides serían guiados al sitio de fertilización a través de una combinación de mecanismos termotácticos, reotácticos y quimiotácticos (Wachten et al., 2017).

Durante su tránsito por el tracto femenino, los espermatozoides de mamíferos sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que, en conjunto, se denominan capacitación y les proveen la capacidad para poder penetrar el ovocito (Austin, 1951, 1952; Chang, 1951). Entre dichos cambios se encuentran la remoción del colesterol de la membrana, la pérdida de factores decapacitantes, la redistribución de antígenos de superficie, el influjo de bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}), el aumento del pH intracelular y la hiperpolarización de la membrana plasmática (Visconti et al., 2011). Dado que el espermatozoide es una célula transcripcional y traduccionalmente silente, los cambios observados de la capacitación resultan de las modificaciones en las concentraciones de mensajeros intracelulares tales como AMP cíclico y Ca^{2+} , del flujo de iones a través de la membrana plasmática, y de las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y defosforilación de proteínas (Puga Molina et al., 2018). Se ha demostrado, por ejemplo, que durante la capacitación es fundamental el influjo de calcio a través de CatSper, el principal canal de Ca^{2+} del espermatozoide (Ren et al., 2001), el cual resulta esencial para

la fertilidad masculina (Ren et al., 2001; Hildebrand et al., 2010; Smith et al., 2013). Durante el proceso de capacitación, todos estos cambios están modulados en forma espacio-temporal (Visconti, 2009; Battistone et al., 2013) y conducen a la obtención de espermatozoides completamente capacitados al momento de encontrarse con el ovocito (Yanagimachi, 1994; Bedford, 2004). A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe atravesar el tracto femenino para capacitarse y adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* incubando a los espermatozoides en medios definidos (Yanagimachi y Chang, 1963; Toyoda y Chang, 1974; Visconti et al., 1995a; b).

Las modificaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios en el espermatozoide que le permiten sufrir un evento exocítico en la cabeza, denominado reacción acrosomal, y el desarrollo de un patrón de motilidad vigoroso en la cola, llamado hiperactivación (Yanagimachi, 1994).

La reacción acrosomal es un evento exocítico con liberación regulada de moléculas intra-acrosomales que permitirían al espermatozoide penetrar las envolturas que rodean al ovocito y que le otorgan la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial. A nivel molecular, se ha reportado que distintos estímulos fisiológicos (entre ellos, la progesterona) desencadenan la reacción acrosomal (Vigil et al., 2011) a través de la transducción de señales que produce el aumento del Ca^{2+} intracelular y de otros mensajeros secundarios tales como el AMP cíclico (Stival et al., 2016).

Por otro lado, la hiperactivación es un patrón de motilidad que consiste en un movimiento flagelar vigoroso (Yanagimachi, 1994), caracterizado por una disminución en la linealidad y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza. En medios de baja viscosidad, este tipo de motilidad da lugar a movimientos del flagelo similares a latigazos (Suarez et al., 1992; Suarez y Pacey, 2006). En este sentido, se ha sugerido que la motilidad hiperactivada le permite al espermatozoide penetrar más eficientemente las sustancias visco-elásticas (Suarez, 1996), como pueden ser el fluido oviductal, la matriz extracelular del *cumulus oophorus* y la ZP. Por otro lado, la hiperactivación podría ayudar a los espermatozoides a ascender desde el oviducto al sitio de fertilización, permitiéndoles disociarse de la adhesión transitoria que establecen con el epitelio oviductal (Yanagimachi, 1994; Suarez, 1996). A nivel molecular, se ha descrito que la alcalinización de los

espermatozoides, el AMP cíclico y el aumento de Ca^{2+} , así como también la progesterona, gatillarían la hiperactivación (Ho y Suarez, 2001).

El proceso de fertilización

En la mayoría de las especies, los espermatozoides que logran atravesar la unión útero-tubaria se almacenan en el *isthmus* hasta el momento de la ovulación (Fig. 6A). El epitelio del *isthmus* genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un período de tiempo hasta que se desencadena la ovulación. Cuando esta última ocurre, ciertos factores femeninos estimulan la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal. Los mecanismos de selección en el oviducto ayudan a reducir el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fertilización, la *ampulla* (Hunter, 1996) (Fig. 6A). Las células del cúmulus, a su vez, secretarían sustancias con propiedades quimioattractantes, tales como progesterona y otros factores (Guidobaldi et al., 2012; Ernesto et al., 2015), que contribuirían al ascenso de los espermatozoide hacia la *ampulla* y a la localización del ovocito.

Una vez que el espermatozoide se encuentra con el ovocito en la *ampulla* del oviducto, ocurre el proceso de fertilización (Fig. 6B). En primer lugar, el espermatozoide capacitado deberá atravesar las diferentes envolturas que rodean al ovocito (*cumulus oophorus* y ZP) para contactarse y fusionarse con el oolema. Dicho proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-*cumulus oophorus* y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culmina con la fusión de las membranas (Fig. 6B) que desencadena la activación del ovocito.

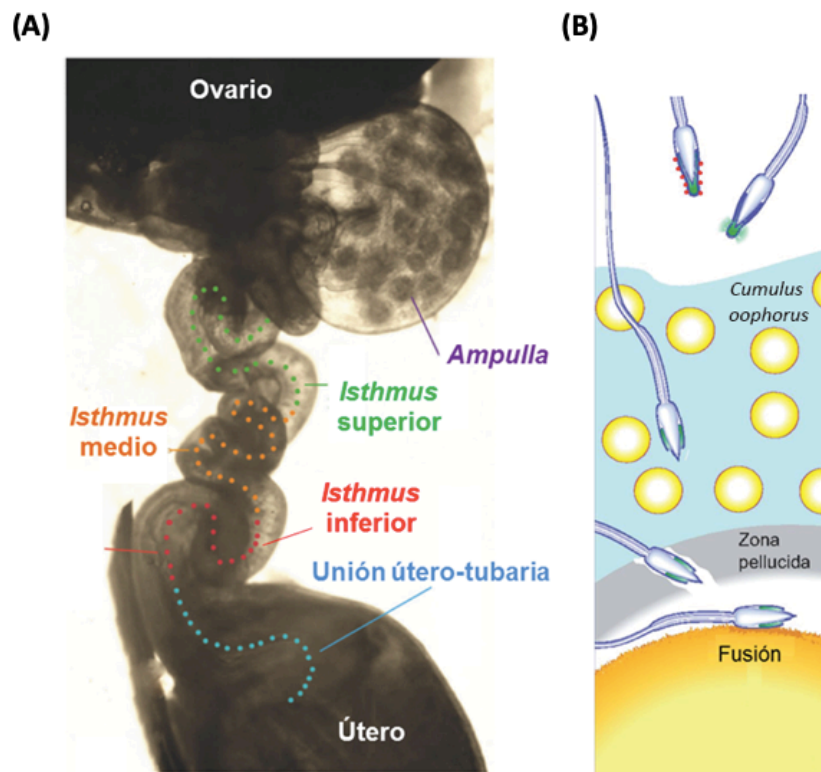


Figura 6. Proceso de fertilización. (A) Se muestra un detalle del tracto femenino murino, indicándose las diferentes regiones del oviducto. Nótese los COCs a través de la pared de la *ampulla*. (Adaptado de La Spina et al., 2016). (B) Esquema del proceso de fertilización que involucra la penetración del *cumulus*, la unión y penetración de la ZP por parte del espermatozoide y la fusión de las gametas (Adaptado de Okabe, 2013).

En una primera etapa, el espermatozoide debe penetrar el *cumulus oophorus*. Tal como se describió anteriormente, los componentes predominantes de la matriz del *cumulus* son el ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos que le proveerían a dicha estructura las propiedades viscoelásticas que lo caracterizan. Por lo tanto, los espermatozoides deben avanzar a través de esta matriz extracelular para alcanzar al ovocito. Si bien aún existe controversia respecto a los mecanismos involucrados durante la penetración del *cumulus*, se ha reportado que los espermatozoides poseerían en su membrana hialuronidasas, como SPAM1 y HYAL5, que favorecerían su pasaje a través de él (Kim et al., 2005). Por otra parte, como consecuencia de la reacción acrosomal se liberarían del acrosoma enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, esta matriz extracelular y permitir al espermatozoide avanzar entre las células del *cumulus* (Fléchon, 2016). Más aún, la hiperactivación también podría jugar un rol importante en la penetración de este medio viscoelástico (Ho y Suarez, 2001).

Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP a la cual se une por interacciones especie-específicas entre moléculas de esta envoltura y la superficie espermática. Si bien históricamente se creía que la unión con ZP3 gatillaba la reacción acrosomal (Gupta y Bhandari, 2011), múltiples evidencias en ratón indican que la misma comienza antes de que el espermatozoide entre en contacto con la ZP (Jin et al., 2011), posiblemente en el *isthmus* oviductal (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). Al día de hoy, se acepta que el espermatozoide reaccionado se une a la proteína ZP2, ya que su proteólisis previene la unión y posterior penetración de esta envoltura (Avella et al., 2013, 2014). La reacción acrosomal, a su vez, es una condición necesaria para la posterior penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994). Si bien el mecanismo por el cual el espermatozoide penetra la ZP no ha sido completamente dilucidado, se han propuesto dos mecanismos: uno enzimático, que implicaría la degradación de la ZP por acción de las enzimas acrosomales, y uno mecánico, producto de la fuerza mecánica del espermatozoide hiperactivado.

Una vez que el espermatozoide ha penetrado la ZP, rápidamente atraviesa el espacio perivitelino. Este microambiente contiene vesículas secretadas por el ovocito que serían capaces de interactuar con el espermatozoide y favorecerían su capacidad fusogénica (Miyado et al., 2008). Finalmente, tiene lugar la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito. Este proceso comprende la unión de las gametas y la fusión propiamente dicha, tras lo que se evidencia una abrupta cesación del movimiento de la cola del espermatozoide (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi y Phillips, 1980): la parte posterior de la cabeza y la cola a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza lo haría de un modo similar a la fagocitosis.

Los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambas células ya que no toda la membrana plasmática de las gametas es fusogénica. En el ovocito de roedores, la fusión normalmente ocurre por la zona donde se encuentran las microvellosidades, y no por la membrana que recubre el huso meiótico (Johnson, 1975; Ebensperger y Barros, 1984). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y se libera por esta región luego de la fertilización, por lo cual el espermatozoide

podría interferir con la correcta reasunción de la meiosis o liberación del corpúsculo, o bien ser eliminado durante el proceso de extrusión. Durante la interacción con el ovocito, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades y se fusiona inicialmente con el oolema a través de la membrana que cubre al segmento ecuatorial (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988; Arts et al., 1993). La reacción acrosomal es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión ya que sólo luego de dicha exocitosis el segmento ecuatorial adquiere propiedades fusogénicas (Yanagimachi, 1994). Por otra parte, si bien la motilidad progresiva parecería no ser un requisito absoluto para la fusión, un cierto movimiento oscilatorio de la cabeza espermática en contacto con el oolema sería necesario para estimular la fusión de las membranas (Ravaux et al., 2016).

La especie-especificidad del proceso de fusión de gametas es menos restringida que para la penetración de la ZP, siendo posible en algunos casos la fusión de gametas heterólogas. Esto ocurre sólo con gametas provenientes de determinadas especies, y no siempre en ambas direcciones. Como ejemplo, los espermatozoides de ratón pueden fusionarse con ovocitos de rata, pero no a la inversa (Yanagimachi, 1994). El ovocito de hámster sin ZP, por su parte, puede ser penetrado por espermatozoides de distintas especies incluyendo humanos (Yanagimachi, 1994).

Si bien el proceso de fusión es un punto clave de la fertilización, la información disponible sobre los mecanismos moleculares involucrados en esta etapa es escasa. Al día de hoy, las principales proteínas descritas que resultan fundamentales para la etapa de fusión de las gametas son la tetrasparina CD9 y JUNO (receptor de folato 4) en el ovocito, y la proteína acrosomal IZUMO1 en el espermatozoide (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). En este sentido, la falta de estas proteínas en las gametas murinas correspondientes conducen a fallas en la fusión de sus membranas, lo que da lugar a animales infértiles. En particular, CD9 participaría en el reclutamiento de distintos intermediarios que conforman los sitios específicos de adhesión en el oolema (Jégou et al., 2011; Wang et al., 2011). Además, se ha descrito que esta proteína estaría presente en vesículas membranosas secretadas por el ovocito hacia el espacio perivitelino, las cuales serían capaces de interactuar con el espermatozoide y participarían en la fusión de gametas (Miyado et al., 2008). Por otro lado, recientemente se ha descrito que JUNO ovocitaria interactúa con IZUMO1 espermática en forma especie-

específica (Bianchi et al., 2014), mediando la fusión de las gametas. Más aún, IZUMO1 humana tendría la capacidad de interactuar con JUNO de hámster, siendo éste el posible mecanismo por el cual los ovocitos de dicha especie pueden fusionarse con espermatozoides humanos (Bianchi y Wright, 2014). Finalmente, luego de la fertilización, JUNO sería liberada rápidamente al espacio perivitelino, contribuyendo al mecanismo de bloqueo de la polispermia a nivel del oolema (Bianchi et al., 2014).

Se han reportado además otras moléculas que, a pesar de no ser esenciales, son relevantes para el proceso de fusión de las gametas, tales como los miembros de la familia de Proteínas Secretorias Ricas en Cisteína (CRISP), descritas principalmente en la gameta masculina (Da Ros et al., 2015). Sin embargo, al día de hoy se desconocen las proteínas que inducen específicamente la fusión de las membranas en mamíferos (Wright y Bianchi, 2016). En este sentido, la reciente identificación del primer fusógeno sexual en plantas, HAP2, perteneciente a la super-familia de Fusexinas (*fusion proteins essential for sexual reproduction*) (Valansi et al., 2017) abre la posibilidad de que el fusógeno en mamíferos pertenezca a esa familia.

Activación del ovocito

La fusión con el espermatozoide gatilla en el ovocito una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que en conjunto se denominan activación ovocitaria y constituyen los primeros pasos del desarrollo embrionario. Este proceso incluye eventos tempranos como la exocitosis de los GC y la reasunción de la meiosis; y eventos tardíos, entre los que se encuentran la extrusión del segundo corpúsculo polar, la descondensación de la cabeza espermática y el reclutamiento de mRNA (Yanagimachi, 1994; Raz y Shalgi, 1998).

En mamíferos, el espermatozoide desencadena la activación del ovocito al gatillar una serie de aumentos repetidos de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) conocidos como “oscilaciones de calcio” (Sanders y Swann, 2016), que orquestan los distintos eventos moleculares y celulares subsiguientes. Estas oscilaciones duran varias horas y son tanto necesarias como suficientes para la activación ovocitaria luego de la fertilización (Kline y Kline, 1992a; Ozil et al., 2005). En el ovocito de ratón empiezan entre 1 y 2 minutos luego

de la fusión de gametas (Lawrence et al., 1997), y se originan espacialmente en el punto de fusión con el espermatozoide (Deguchi et al., 2000). Las posteriores oscilaciones consisten en olas de calcio a través del citoplasma del ovocito (Deguchi et al., 2000), y pueden persistir alrededor de unas 6 horas hasta la formación de los pronúcleos (Marangos et al., 2003). La frecuencia de estas oscilaciones varía considerablemente entre especies, habiendo picos de $[Ca^{2+}]_i$ cada 10-20 minutos en ovocitos de ratón, mientras que en el humano o bovino se observan cada 30-60 minutos (Taylor et al., 1993; Fissore et al., 1995; Deguchi et al., 2000).

Actualmente se acepta que, en mamíferos, el espermatozoide introduce un factor soluble en el ovocito que induce las oscilaciones de calcio (Jones, 2005; Swann et al., 2006; Yu et al., 2008). Este factor sería una isoforma de PLC específica de testículo denominada PLC ζ (Saunders et al., 2002), presente en las regiones post-acrosomal y ecuatorial del espermatozoide (Fujimoto et al., 2004; Heytens et al., 2009; Escoffier et al., 2016). En particular, se observó que la microinyección de PLC ζ , como RNA o como proteína, causa oscilaciones de calcio en ovocitos de ratón, vaca, cerdo o humano (Saunders et al., 2002; Kouchi et al., 2004; Rogers et al., 2004; Ross et al., 2008; Ito y Kashiwazaki, 2012; Nomikos et al., 2013), a niveles comparables a los producidos por un único espermatozoide (Saunders et al., 2002; Ross et al., 2008). Más aún, tanto pacientes con globozoospermia, cuyos espermatozoides carecen de PLC ζ (Yoon et al., 2008), así como hombres con mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (Escoffier et al., 2016), presentan falla de fertilización luego de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), sugiriendo que PLC ζ jugaría un rol fundamental para la activación del ovocito. Recientemente, se han generado ratones carentes de PLC ζ , cuyos espermatozoides son incapaces de gatillar las oscilaciones de calcio en el ovocito (Hachem et al., 2017; Nozawa et al., 2018), confirmando que esta proteína sería la responsable de producir los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ durante la activación.

Una vez introducida en el ovocito, PLC ζ produciría inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) presente en vesículas intracelulares (Yu et al., 2012) (Fig. 7). El aumento de IP $_3$ a su vez mediaría la liberación de Ca $^{2+}$ desde los reservorios intracelulares, como el retículo endoplasmático, a través de su receptor IP $_3$ R1 (Miyazaki et al., 1992). La interacción de IP $_3$ con su receptor lleva a un

cambio conformacional que produce la apertura de un canal de calcio en los reservorios intracelulares, permitiendo la liberación de este catión. Durante la activación, los niveles de IP_3 también generan la sensibilización y posterior degradación de IP_3R1 , produciendo una disminución en la periodicidad de las oscilaciones (Miyazaki et al., 1993; Jellerette et al., 2000; Lee et al., 2010). Por otra parte, si bien el retículo endoplasmático sería el principal reservorio de calcio en el ovocito (Gardiner y Grey, 1983), las mitocondrias también contribuirían a esta función, además de su rol en la fosforilación oxidativa (Dumollard et al., 2004). En este sentido, ovocitos con menor cantidad de mitocondrias o función mitocondrial alterada presentarían problemas de activación con fallas en el patrón de oscilaciones de calcio (Yeste et al., 2016). Más aún, se ha descrito que luego de la fertilización hay una reorganización de organelas que genera la colocalización de mitocondrias y retículo endoplasmático, sugiriendo que ambas estructuras podrían actuar en forma cooperativa (Iwai et al., 2018).

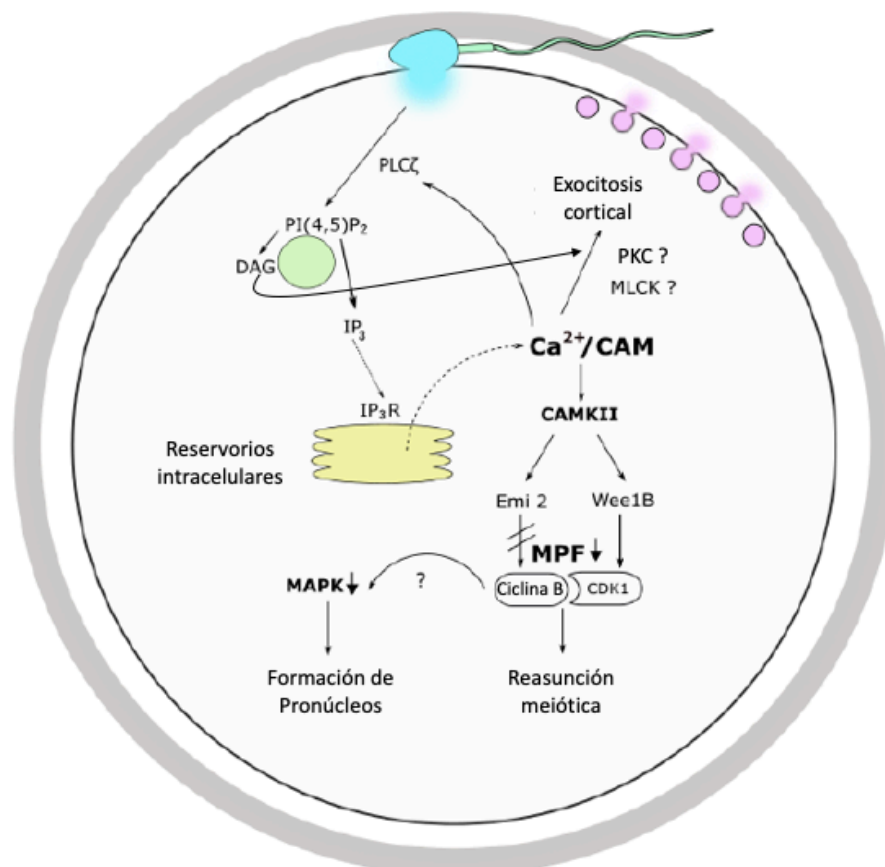


Figura 7. Activación del ovocito. Representación de las cascadas de señalización gatilladas por la fusión del espermatozoide que llevan a la exocitosis cortical, la reasunción de la meiosis y la formación de los pronúcleos (Adaptado de Sanders y Swann, 2016).

Si bien no es del todo claro cómo se mantienen en el tiempo las oscilaciones de calcio, se han propuesto dos mecanismos regulatorios que podrían coexistir en el ovocito de mamífero (Machaty, 2016). En el primer mecanismo, la actividad de PLC ζ podría ser modulada por el propio aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Nomikos et al., 2005) produciendo oscilaciones del mensajero IP $_3$, quien actuaría sobre sus receptores en los reservorios para dar la respuesta oscilatoria del catión (Dupont y Dumollard, 2004). En el segundo, el Ca $^{2+}$ mismo podría actuar directamente sobre IP $_3$ R (De Young y Keizer, 1992), permitiendo la salida del catión solamente cuando la concentración intracelular del mismo es baja.

Luego de cada pico de Ca $^{2+}$, los niveles de este catión son rápidamente restablecidos por acción de las bombas de calcio SERCA que lo transportan en forma activa dentro del retículo endoplasmático (Kline y Kline, 1992b; Wakai et al., 2013) y las bombas PMCA y los intercambiadores Na $^+$ /Ca $^{2+}$ presentes en la membrana plasmática que lo extrudan (Carroll, 2000). Por otra parte, se ha reportado que el influjo de calcio extracelular sería fundamental para mantener las oscilaciones (Kline y Kline, 1992a; Shiina et al., 1993), siendo necesario para el relleno de los reservorios intracelulares (Miyazaki, 1991; Wakai et al., 2013). En este sentido, el tratamiento con tapsigargina, un inhibidor de las bombas SERCA que promueve el vaciamiento de los reservorios intracelulares, induce el influjo de calcio extracelular en ovocitos de distintas especies (Kline y Kline, 1992b; Macháty et al., 2002; Martín-Romero et al., 2008). El mecanismo por el cual la salida de calcio de los reservorios gatilla su entrada del medio extracelular se conoce como SOCE (*store-operated calcium entry*) y ha sido bien descrito en otros tipos celulares (Clapham, 2007). Sin embargo, si bien en células somáticas SOCE está mediado por los sensores de Ca $^{2+}$ STIM1/2 en el retículo y los canales ORAI en la membrana plasmática, estudios realizados con inhibidores de SOCE y ratones mutantes para estas proteínas sugieren que las mismas no serían requeridas para la maduración y activación ovocitaria (Miao et al., 2012; Bernhardt et al., 2017). En este sentido, recientemente se ha descrito que los principales canales del oolema que intervendrían en el influjo de calcio extracelular y la ocurrencia de oscilaciones son el canal de tipo T activado por voltaje Cav3.2 (también responsable del influjo durante la maduración (Bernhardt et al., 2015)) y TRPM7 (receptor de potencial transitorio M7 (Bernhardt et al., 2018)). Más aún, el influjo que previamente era atribuido al mecanismo SOCE sería principalmente a través de TRPM7 (Bernhardt et al., 2018). Por otra parte, el

canal TRPV3 presente en el ovocito también podría contribuir a las oscilaciones (Carvacho et al., 2013). Estas evidencias respecto a la presencia de diferentes canales en el ovocito sugieren que la entrada de calcio extracelular podría cumplir otras funciones además del relleno de los reservorios intracelulares.

Las modificaciones en el calcio intracelular, unido a la proteína citoplasmática calmodulina (CaM), orquestan los distintos fenómenos asociados a la activación (Ducibella et al., 2006; Ozil et al., 2006) (Fig. 7). Entre los cambios más importantes, se encuentran la exocitosis de los GC, fundamental para el bloqueo de la polispermia, y la reasunción de la detenida meiosis (Fig. 7), además de cambios en el citoesqueleto de actina el cual participa en la modulación de los distintos eventos.

En ausencia de espermatozoides, estos eventos pueden ser gatillados *in vitro* por técnicas de activación artificial o partenogenética del ovocito (Nasr-Esfahani et al., 2010). Los métodos de activación partenogenética incluyen estímulos mecánicos, eléctricos o químicos que promueven la salida del arresto meiótico, muchas veces producto de un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el ovocito (Alberio et al., 2001; Nasr-Esfahani et al., 2010; Vanden Meerschaut et al., 2014). En particular, la activación química es el procedimiento más comúnmente utilizado e incluye el uso de ionóforos de calcio, inhibidores de quinasas y de síntesis de proteínas, $SrCl_2$, ésteres de forbol, timerosal, etanol y quelantes de Zn^{2+} , entre otros (Yanagida et al., 2008; Nasr-Esfahani et al., 2010; Suzuki et al., 2010b; Uh et al., 2019).

Exocitosis de gránulos corticales (GC)

La exocitosis de GC es un evento clave de la activación ovocitaria. Pocos minutos luego de producida la fusión de las gametas y como consecuencia del aumento de $[Ca^{2+}]_i$, los GC se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido hacia el espacio perivitelino (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Ducibella, 1996). La función principal de esta exocitosis es la prevención de la polispermia tal como se describirá más adelante (ver Bloqueo de Polispermia).

A diferencia de la exocitosis en otros tipos celulares donde generalmente ocurren varios ciclos de exo-endocitosis, la exocitosis cortical es un evento que ocurre una única vez. Sin embargo, a nivel molecular, la fusión de los GC con el oolema involucraría la

participación de distintos efectores que mediarían procesos exocíticos en otros sistemas tales como proteínas de la vía de SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) y de pequeñas GTPasas, como Rab3A (Masumoto et al., 1996; Ikebuchi et al., 1998; Iwahashi et al., 2003; Tsai et al., 2011; De Paola et al., 2015; Bello et al., 2016). En otros tipos celulares, se ha descrito que la exocitosis regulada por calcio puede ocurrir principalmente por dos mecanismos: el mecanismo de “*kiss-and-run*”, en el cual se produce un pequeño poro de fusión por el que se libera el contenido de las vesículas, o de fusión total, en la cual el poro de fusión se dilata hasta que la vesícula colapsa completamente con la membrana plasmática (Sokac y Bement, 2006; Wu et al., 2014a). Si bien el mecanismo por el cual ocurre la exocitosis cortical en ovocitos de mamíferos no ha sido descrito, un reporte sugiere la existencia de un tipo de mecanismo denominado “*kiss-and-coat*”, caracterizado por el recubrimiento de las vesículas con actina filamentosa (F-actina), y que sería el responsable de la exocitosis cortical en diversas especies (Sokac y Bement, 2006). A diferencia de los otros dos mecanismos, el de “*kiss-and-coat*” resultaría en un evento de fusión más lento, formaría poros de fusión de menor tamaño y sería importante para la exocitosis de gránulos relativamente grandes (Sokac y Bement, 2006). En este sentido, todas estas características han sido descritas para la exocitosis de GC en ovocitos de erizos de mar (Whalley et al., 1995), peces (Becker y Hart, 1999) y anfibios (Bement et al., 2000). Más aún, en ovocitos de *Xenopus* se describió que aquellos gránulos que se fusionan con la membrana se recubren de F-actina (Sokac et al., 2003). Estos recubrimientos además podrían contribuir a la re-incorporación de la membrana del GC fusionado a través de un mecanismo de endocitosis compensatoria (EC) (Sokac et al., 2006), la cual se ha reportado tanto en ovocitos de erizo de mar como de *Xenopus* (Whalley et al., 1995; Bement et al., 2000). Si bien la información respecto a la exocitosis cortical en mamíferos es mucho más limitada, la evidencia en diversas especies junto con el hecho de que los GC de mamíferos son más grandes que las vesículas de otras células secretoras (0.2-0.6 μm vs 0.05-0.2 μm) (Liu, 2011), hace posible que en este modelo también ocurra un mecanismo similar al de “*kiss-and-coat*”.

Numerosos estudios en ovocitos de mamífero han propuesto que la activación de la proteína quinasa C (PKC) gatillaría la exocitosis cortical (Fig. 7). Esto se debe a las siguientes evidencias: PKC se activa y trasloca a la membrana luego de la fertilización (Halet,

2004); los ésteres de forbol o DAGs sintéticos estimulan la exocitosis en ovocitos de rata (Eliyahu y Shalgi, 2002) y los inhibidores de PKC la previenen luego de la estimulación con un ionóforo de calcio (Ducibella y LeFevre, 1997). Sin embargo, la relevancia de estos resultados no es clara ya que los inhibidores de PKC no inhiben la exocitosis gatillada por la fertilización en ratón (Ducibella y LeFevre, 1997). Por otra parte, dado que los niveles producidos de DAG en la membrana no serían suficientes para su activación (Halet, 2004; Yu et al., 2012) se ha propuesto que la actividad de PKC podría estar modulada por $[Ca^{2+}]_i$ (Yu et al., 2008). En este sentido, las vías de CaM y PKC podrían converger en la translocación de las MARCKS (sustratos de PKC ricos en alanina miristoilada) a la membrana plasmática (Eliyahu et al., 2006), las cuales también participarían en la exocitosis cortical (Eliyahu et al., 2006; Tsaadon et al., 2008). Finalmente, se ha propuesto que MLCK (quinasa de la cadena liviana de miosina), dependiente de CaM, podría participar de la translocación de los GC a la membrana plasmática para su fusión, ya que la inhibición de esta quinasa en ovocitos murinos previene la exocitosis luego de la fertilización (Matson et al., 2006) (Fig. 7).

Bloqueo de polispermia

El bloqueo de la polispermia luego de la fertilización es fundamental ya que la entrada de más de un espermatozoide al ovocito resultaría en un desarrollo anormal. Este bloqueo se establece en mamíferos a nivel de la membrana plasmática y/o de la ZP, actuando en forma sinérgica, pero la prevalencia de uno de los mecanismos por sobre el otro puede variar según la especie (Florman y Fissore, 2015). Por ejemplo, en hámster, perro y humano ocurre principalmente a nivel de la ZP, mientras que en conejo y murciélago, ésta tiene lugar principalmente a nivel del oolema (Florman y Fissore, 2015). En otras especies, como en ratas, ratones y gatos el bloqueo ocurriría tanto a nivel de la ZP como de la membrana plasmática (Florman y Fissore, 2015).

Actualmente se propone que el bloqueo a nivel de la ZP ocurre principalmente por el clivaje de ZP2 mediada por ovastacina, enzima contenida en los GC, y liberada al espacio perivitelino tras la exocitosis cortical (Burkart et al., 2012). Esta modificación en la ZP la haría impenetrable para otros espermatozoides. Por otro lado, si bien no se conocen completamente las bases moleculares que aseguran el bloqueo a nivel del oolema, se ha

propuesto que la liberación de JUNO en forma de exosomas contribuiría a este mecanismo (Bianchi et al., 2014). Es importante destacar que, a diferencia del bloqueo a nivel de la ZP, el de la membrana plasmática sólo sería inducido por la fusión espermatozoide-ovocito, y no ocurre en ovocitos activados artificialmente o por microinyección del espermatozoide (Maleszewski et al., 1996; Gardner y Evans, 2006; Wortzman-Show et al., 2007; Bianchi et al., 2014). Finalmente, estudios recientes muestran que los GC de ovocitos de mamíferos contienen Zn^{2+} (Kim et al., 2011; Que et al., 2015) y que la exocitosis gatillada por el espermatozoide o por la activación con ionóforo de calcio produce la liberación de este catión al espacio extracelular (Kim et al., 2011; Duncan et al., 2016). El Zn^{2+} así liberado podría cumplir un rol adicional en la prevención de la polispermia tanto a nivel de la ZP (Que et al., 2017) así como mediante un efecto quimio-repelente de los espermatozoides (Guidobaldi et al., 2017).

Reasunción del ciclo celular

El evento mejor caracterizado de la activación ovocitaria en mamíferos es la reasunción y compleción de la detenida meiosis, con extrusión del segundo corpúsculo polar, y seguida por la formación de los pronúcleos (Jones, 2007) (Fig. 7).

El arresto meiótico en MII en el ovocito es mantenido por una alta actividad de MPF, el cual está formado principalmente por ciclina B y CDK1 (quinasa dependiente de ciclina) (Choi et al., 1996; Abrieu et al., 1997) (Fig. 7). Los altos niveles de Ca^{2+} citoplasmático asociado a CaM activan a CAMKII (proteína quinasa II dependiente de CaM) (Ducibella y Fissore, 2008) que lleva a una degradación de MPF mediada por APC (Complejo Promotor de la Anafase). En particular, estudios con ratones carentes de CamKIIy demostraron que esta isoforma es la responsable de la reasunción de la meiosis luego de la fertilización (Backs et al., 2010). Existen dos vías mecánicas por las que CAMKII conduciría a la reasunción de la meiosis. Por un lado, CAMKII fosforila Emi2 (Madgwick y Jones, 2007), bloqueando su capacidad de inhibir APC. Como consecuencia, APC destruye Emi2, así como la cohesión que mantiene juntas a las cromátides hermanas, y degrada a la ciclina B, llevando a una pérdida de actividad de MPF (Hansen et al., 2006). En la otra vía, CAMKII fosforila la quinasa Wee1B, la cual a su vez fosforila CDK1 e inhibe la actividad MPF (Oh et al., 2011) (Fig. 7).

La compleción de la meiosis está marcada por la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación del pronúcleo femenino y está descrito que la entrada a la interfase depende de la disminución en la actividad de MAPK (ERK1 y ERK 2 principalmente) (Moos et al., 1996) (Fig. 7), que involucra la actividad de MEK y de Mos (Dupré et al., 2011). Por otra parte, luego de la incorporación del espermatozoide al ooplasma, se forma el pronúcleo masculino tras la desintegración de la envoltura nuclear, la descondensación de la cromatina (con reemplazo de protaminas por histonas), y la formación de una nueva envoltura (McLay y Clarke, 2003). Finalmente, ambos pronúcleos migran al centro de la célula (Schatten, 1994).

Si bien un único aumento de $[Ca^{2+}]_i$ es capaz de gatillar la reasunción de la meiosis, se requieren varios transientes para completar este proceso y lograr la reducción total de la actividad de MPF (Tatone et al., 2002). En particular, mediante el uso de estímulos eléctricos se ha visto que en el ovocito murino son necesarios al menos 8 aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ para asegurar la formación de los pronúcleos (Ducibella et al., 2002). En este sentido, cabe destacar que el tratamiento con ionóforos de calcio produce un único pico de calcio que es suficiente para activar el desarrollo (Winston et al., 1991). Sin embargo, si bien el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ producido por ionóforos es mucho mayor y más largo que el observado luego de la fertilización, estos tratamientos no son muy efectivos en diversas especies y deben ser utilizados en combinación con inhibidores de quinasas o de la síntesis de proteínas que contribuyan a reducir la actividad de MPF (Jílek et al., 2000).

Una vez ensamblados los pronúcleos masculino y femenino, tiene lugar en ellos la síntesis de ADN necesaria para la primera división mitótica. En ratón, existen diferencias en los niveles de metilación de ADN, acetilación y metilación de histonas entre el pronúcleo materno y paterno, generando esto una actividad transcripcional más temprana en el paterno respecto al materno (Adenot et al., 1997; Cowell et al., 2002; Mann y Bartolomei, 2002). Finalizadas la síntesis de ADN y de proteínas necesarias, ocurre un nuevo aumento en los niveles de MPF, resultando en la ruptura de las envolturas pronucleares y en la condensación de los cromosomas maternos y paternos, los cuales se alinean en el plano ecuatorial preparando a la cigota (embrión de una célula) para la primera división mitótica (Florman y Fissore, 2015).

Reorganización y funciones del citoesqueleto

Luego de la fertilización, se han observado en los ovocitos cambios en la organización de los microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedios. Mientras que los microtúbulos son importantes para la migración de los pronúcleos y la formación del huso mitótico (Payne et al., 2003), los filamentos de actina participan de distintos eventos. En el ovocito murino habría una despolimerización de actina cortical en la región bajo las microvellosidades (Fig. 8), involucrada en la exocitosis de GC (Terada et al., 2000; Sun y Schatten, 2006). Si bien la incorporación del espermatozoide no requeriría de los filamentos de actina (Maro et al., 1984; Schatten et al., 1986), alrededor del sitio de entrada ocurre la acumulación de F-actina, formando una protrusión citoplasmática denominada “cono de fertilización”, que podría contribuir en parte a la incorporación de las organelas espermáticas (Sun y Schatten, 2006). En este sentido, en la mayoría de las especies estudiadas, tanto la cola del espermatozoide fertilizante como sus mitocondrias son rápidamente incorporadas y degradadas en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Longo, 1973; Sutovsky et al., 1996; Florman y Fissore, 2015). Por otro lado, en el ovocito murino los filamentos de actina controlan la rotación del huso meiótico que, a diferencia de la mayoría de los mamíferos, se encuentra paralelo al oolema (Sun y Schatten, 2006) (Fig 8). La actina también está involucrada en la emisión del segundo corpúsculo polar a través de la formación de un anillo contráctil en conjunto con miosina (Maro et al., 1984) y en la formación de los pronúcleos (Chaigne et al., 2016). Finalmente, recientemente se ha descripto que los microfilamentos también están involucrados en el proceso de mitotaxis (quimiotaxis mitocondrial) luego de la fusión de gametas, donde las mitocondrias maternas migran al sitio de fusión del espermatozoide (Iwai et al., 2018).

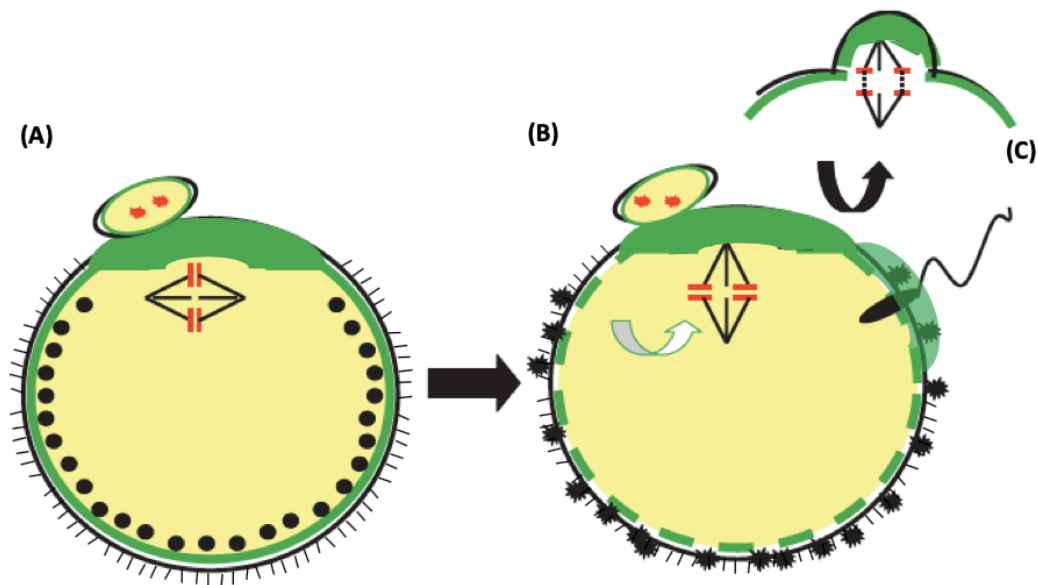


Figura 8. Dinámica del citoesqueleto de actina en el ovocito fertilizado de ratón. (A) El ovocito ovulado, arrestado en MII, presenta el huso meiótico anclado a la membrana plasmática a través de microfilamentos, por debajo de una gruesa capa de actina (verde). Nótese la presencia de GC en la corteza (negro) y las microvellosidades esquematizadas en el oolema. (B) Luego de la penetración del espermatozoide en la región que contiene microvellosidades, ocurre la rotación del huso meiótico, la despolimerización de actina cortical y la exocitosis de GC. Posteriormente, se formará una capa de actina en el sitio de entrada del espermatozoide dando lugar al llamado "cono de fertilización". (C) La extrusión del segundo corpúsculo polar requiere de la formación de un anillo contráctil formado por actina y miosina. (Adaptado de Sun y Schatten, 2006).

Desarrollo embrionario preimplantatorio

El desarrollo embrionario preimplantatorio en mamíferos abarca la migración y fusión de los pronúcleos maternos y paternos en el estadio de una célula, la reprogramación genética y epigenética, la activación del genoma embrionario y una serie de divisiones mitóticas que resultan en la formación de una mórula compactada que luego se desarrolla a un blastocisto compartimentalizado, preparado para la implantación (Ramathal et al., 2015).

Luego de la fertilización, la cigota experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un aumento del número de células cada vez más pequeñas, sin cambiar el tamaño total del embrión (Bell et al., 2008) (Fig. 9). La mitosis continúa durante el desarrollo preimplantatorio hasta que ocurre la compactación (en el estadio de 8 ó 16 células en el ratón o el humano, respectivamente) para formar la mórula (Mulnard y Huygens, 1978), siendo la primera indicación morfológica de una disrupción en la simetría radial durante el desarrollo. Se cree que la compactación es esencial para los eventos

morfogenéticos tardíos como la especificación del linaje (Kidder y McLachlin, 1985; Levy et al., 1986). En conjunto con la adhesión celular, ocurre la polarización intracelular, con acumulación de actina y microtúbulos en los dominios apicales de cada blastómera, y movimiento basolateral de los núcleos (Reeve y Kelly, 1983; Johnson y Maro, 1984; Houliston y Maro, 1989). Una vez ocurrida la compactación y polarización, las divisiones subsecuentes y el destino de las células hijas están determinados por la orientación del plano de clivaje (Johnson y Ziomek, 1981; Sutherland et al., 1990). A través de divisiones simétricas y asimétricas se generan a continuación dos poblaciones celulares distintivas: las células interiores formarán el macizco celular interno (MCI), mientras que las exteriores contribuirán al trofotodermo. Este proceso termina con la formación del blastocisto que comprende una cavidad llena de líquido denominada blastocelo y el MCI rodeado de células del trofotodermo (Fig. 9). Mientras que el MCI dará lugar al embrión, el trofotodermo formará las porciones fetales de la placenta más tarde en el desarrollo (Edwards et al., 1981). Finalmente, como parte de la preparación para su implantación en el útero, el blastocisto eclosiona de la ZP, permitiendo así el crecimiento y desarrollo del embrión, y el acceso de las células del trofotodermo al epitelio uterino para su adhesión.

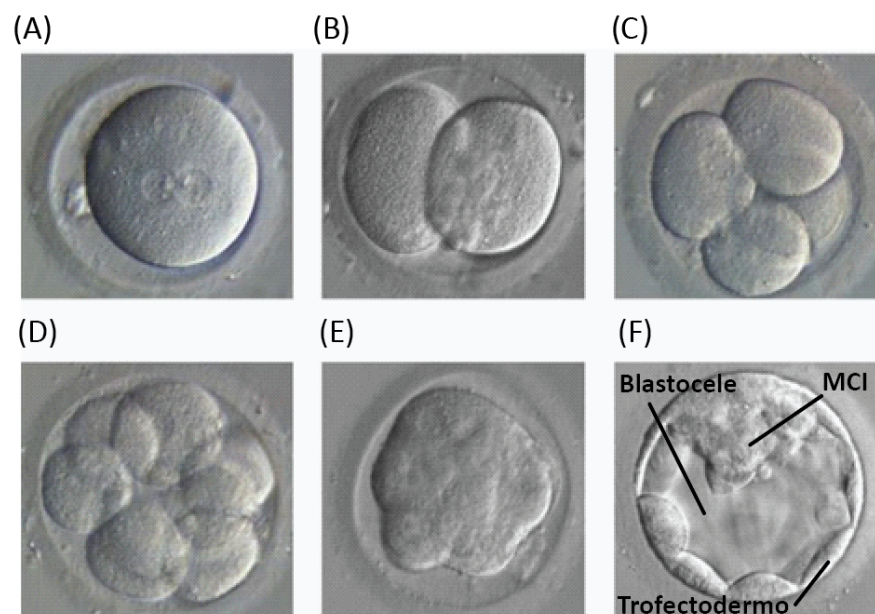


Figura 9. Desarrollo embrionario preimplantatorio. Microfotografías correspondientes a embriones humanos de una (A), dos (B), cuatro (C) y ocho (D) células, mórulas (E) y blastocistos (F). MCI: Macizo celular interno. Los estadios mostrados son representativos de los mamíferos en general.

En forma concomitante con el desarrollo preimplantatorio, y como consecuencia de las contracciones musculares y de la motilidad de las ciliias oviductales, los embriones son transportados desde la *ampulla*, a través del *isthmus*, al útero donde ocurrirá la implantación (Lyons et al., 2006).

Fisiología uterina e implantación

El endometrio uterino es una estructura dinámica que cicla a través de períodos de crecimiento y diferenciación para facilitar la implantación embrionaria. Esto ocurre en forma concomitante con los cambios cíclicos que se dan en el ovario. En función de las modificaciones histológicas y funcionales que sufre el útero, el ciclo en la mujer se divide en dos fases: proliferativa y secretoria (Wang y Dey, 2006) (Fig. 10).

Durante la fase proliferativa endometrial (o fase folicular si se hace foco en el ovario), los niveles de estradiol circulantes inducen la proliferación de los componentes celulares del endometrio, resultando en un engrosamiento del tejido. Durante esta fase, se evidencia alta actividad mitótica en el epitelio, el estroma y la vasculatura (Ferenczy, 1979), y en particular se observa que las glándulas endometriales se agrandan y se vuelven más tortuosas, que la red vascular se expande formando un elaborado sistema de vasos sanguíneos y que el estroma prolifera (Ferenczy y Giudice, 1996).

Luego de la ovulación, durante la fase secretoria (o lútea si se hace foco en el ovario), el endometrio queda bajo el control de la progesterona secretada por el cuerpo lúteo, junto con altos niveles circulantes de estradiol (Hess et al., 2006). El aumento post-ovulatorio de los niveles de progesterona inicia una cascada de eventos que conllevan a la secreción glandular y la diferenciación del estroma, necesarias para la adhesión e invasión del embrión. Con el aumento de la progesterona sérica ocurren cambios dramáticos en el endometrio, entre los que se encuentran la acumulación de glucógeno, un aumento de fluido glandular, producto de las células epiteliales y transudado de la vasculatura, y la aparición de protrusiones del epitelio endometrial denominados pinópodos (Mazur et al., 2015). Entre 7 y 10 días luego del pico de LH en mujeres, el endometrio es receptivo para la implantación del embrión, por lo que este período se conoce como “ventana de receptividad” (Giudice, 2004) (Fig. 10). Durante la misma, los cambios en el estroma son

mucho más importantes que los observados previamente en la porción glandular, observándose un aumento en la permeabilidad capilar, mitosis y edema estromal, y proliferación celular del endotelio con la formación de las arterias espiraladas (Noyes et al., 1975; Ferenczy y Giudice, 1996). Estos cambios preceden a la decidualización del estroma, un proceso impulsado por la progesterona en el cual los fibroblastos estromales experimentan una transformación morfológica junto con un cambio a un fenotipo secretorio (Brar et al., 2001; Hess et al., 2006), fundamentales para una implantación exitosa. Por otro lado, se ha descrito la participación de muchos genes en los procesos de receptividad endometrial e implantación (Giudice, 2004; Talbi et al., 2006; Hu et al., 2014). En este sentido, a través de un estudio de marcadores de receptividad se han identificado genes involucrados en la preparación endometrial que servirían clínicamente para una identificación más precisa de la ventana de receptividad respecto a los análisis histológicos (Giudice, 2004; Díaz-Gimeno et al., 2013; Garrido-Gómez et al., 2013).

Si bien en el ratón las fases proliferativa y secretoria no han sido descritas, debido a sus ciclos más cortos e irregulares, la preparación del útero murino sería similar a la del humano con ciertas diferencias temporales (Wang y Dey, 2006) (Fig. 10). En particular, el útero de ratón es receptivo luego de 4 días de la ovulación. Más aún, el desarrollo embrionario a blastocisto ocurre más rápido que en humano (3-4 días vs 5-6 días) (Niakan et al., 2012), garantizando la sincronización con la preparación del útero en cada especie.

Solamente durante la ventana de receptividad del endometrio puede ocurrir el proceso de implantación. El mismo comienza con la aposición del blastocisto en el epitelio luminal y su posterior adhesión, y culmina con la invasión del embrión en la cual el trofotodermo penetra el epitelio luminal (Enders y Schlafke, 1967). A su vez, la interacción entre el blastocisto y el epitelio uterino inicia una cascada compleja de eventos que llevan al desarrollo de la placenta (Bazer et al., 2009). Finalmente, el embrión implantado se desarrolla en el útero materno durante la gestación.

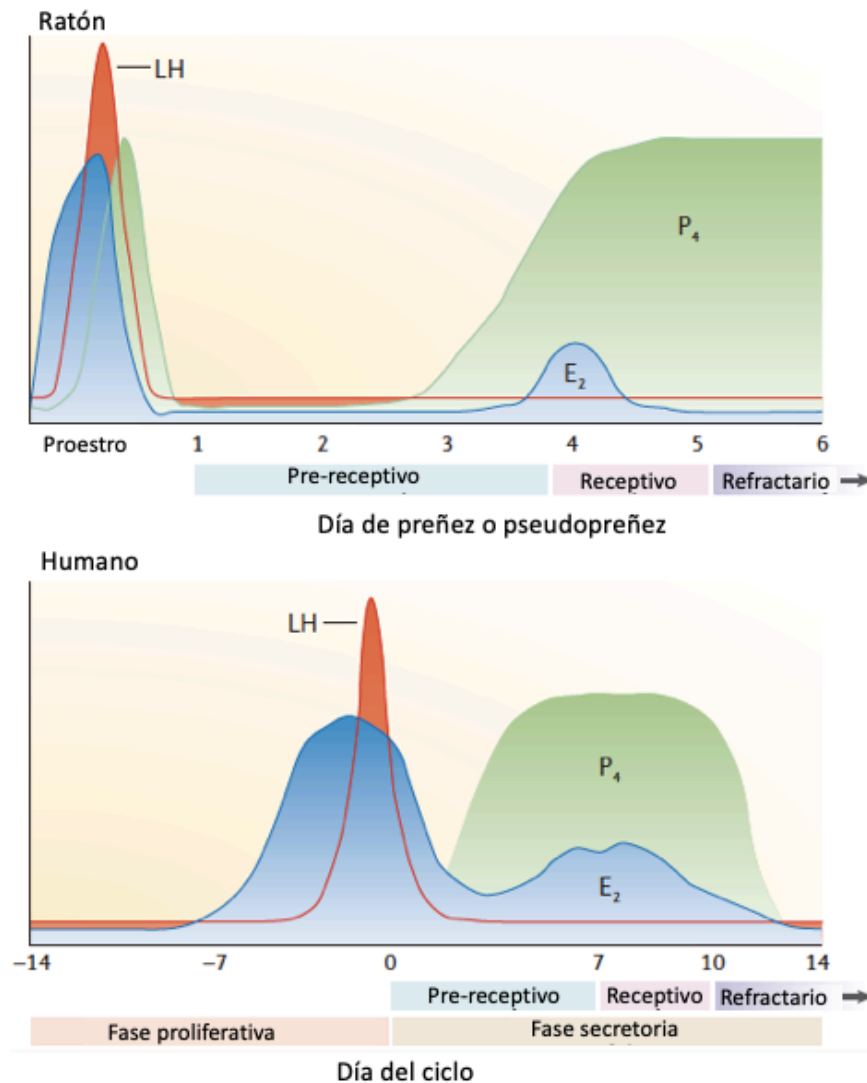


Figura 10. La ventana de receptividad en ratón y en humano. El pico de LH gatilla la ovulación y la secreción de estradiol (E₂) y progesterona (P₄) por el ovario. El útero sufre alteraciones que lo llevan a un estado receptivo para la implantación del blastocisto. Mientras que en ratón esto ocurre alrededor del día 4 de preñez o pseudopreñez, en los humanos el útero es receptivo a la mitad de la fase secretoria (7-10 días luego de la ovulación). Pasado ese tiempo, el útero se vuelve refractario a la implantación. (Adaptado de Wang y Dey, 2006).

Objetivos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve fuertemente la planificación familiar, que permite a las personas decidir el número de hijos que desean tener y el intervalo entre embarazos (OMS, 2018a). Esto abarca no sólo el control de la natalidad a través del uso de métodos anticonceptivos sino también los tratamientos de la infertilidad. En este sentido, el estudio de los mecanismos subyacentes a los eventos involucrados en el proceso reproductivo contribuye tanto al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad así como al diseño de nuevos métodos anticonceptivos y al esclarecimiento del modo de acción de los reguladores de la fertilidad existentes. Por lo tanto, **el objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar aspectos funcionales y moleculares asociados al proceso de fertilización y a la activación ovocitaria mediante dos objetivos específicos que atraviesan ambos aspectos de la salud reproductiva: la infertilidad y la anticoncepción.**

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja sexualmente activa de lograr un embarazo luego de un año de relaciones sexuales sin protección (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013) y es considerada una enfermedad por la OMS (Zegers-Hochschild et al., 2009), la cual afecta entre un 10 y 16% de parejas en el mundo (Fidler y Bernstein, 1999; Boivin et al., 2007; Ombelet et al., 2008; Louis et al., 2013; Thoma et al., 2013; Chandra et al., 2014; ESHRE, 2014). Hoy en día, sin embargo, muchas parejas infértiles logran concebir gracias a las técnicas de reproducción asistida desarrolladas en las últimas décadas, entre las que se encuentran la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, por sus siglas en inglés) (Yeste et al., 2016). La técnica de ICSI, en particular, consiste en la introducción directa de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito (Palermo et al., 1992) y ha demostrado altas tasas de éxito (Vanden Meerschaut et al., 2013, 2014; Neri et al., 2014). No obstante, se han reportado fallas completas de fertilización en 1-5% de los ciclos de ICSI (Mangoli et al., 2008; Yanagida et al., 2008; Nasr-Esfahani et al., 2010; Vanden Meerschaut et al., 2013, 2014). Si bien las mismas podrían ser consecuencia de diversos factores, la principal causa de falla de fertilización en estos casos se debe a defectos en la activación del ovocito (Flaherty et al., 1998; Rawe et al., 2000; Mahutte y Arici, 2003; Vanden Meerschaut et al., 2013, 2014). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la

activación ovocitaria resulta fundamental para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o tratamientos para defectos en estos casos.

Muchos de los hallazgos respecto a la fisiología ovocitaria han provenido del uso de modelos animales, debido a que el ovocito humano resulta un material muy valioso y escaso. En este sentido, a través del uso de ovocitos de ratón, en nuestro laboratorio se reportó por primera vez que la entrada del espermatozoide fertilizante gatilla en el ovocito cambios en la compartimentalización lipídica de su membrana plasmática. En particular, se observó que el ovocito fertilizado sufre la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS) en el oolema (Curia, 2011). Considerando que la fusión de gametas y la activación ovocitaria están estrechamente vinculadas, y que se ha descrito que los lípidos en la membrana jugarían roles críticos para la activación (Buschiazzi et al., 2013), la translocación de PS en el oolema podría ser crucial para la regulación y ocurrencia de los eventos subsiguientes a la fusión de gametas. Por lo tanto, **en el primer Capítulo de esta Tesis abordamos el objetivo general a través del estudio de la translocación de PS en la membrana de ovocitos fertilizados de ratón y su relevancia como modulador molecular de la activación del desarrollo.**

Como contracara del tratamiento y diagnóstico de la infertilidad, la anticoncepción juega un rol fundamental en los programas de planificación familiar. Sin embargo, al día de hoy existe una limitada variedad de métodos disponibles y escaso conocimiento acerca de los mecanismos de acción de los mismos, lo que lleva a un uso incorrecto por parte de los usuarios o a su rechazo en distintos sectores por razones religiosas o culturales (OMS, 2018a). Entre los métodos existentes, se encuentran los anticonceptivos de emergencia (AE), utilizados como última barrera para reducir el riesgo de embarazo en caso de una relación sexual sin protección o de la identificación de una falla en el método anticonceptivo empleado. En la actualidad, los AE recomendados por la OMS son el dispositivo intrauterino (DIU) de cobre o las píldoras a base de levonorgestrel (LNG) (solo o combinado con etinilestradiol) o acetato de ulipristal (UPA, por sus siglas en inglés) conocidas como “píldoras del día después” (OMS, 2018b). En escasos países, por otra parte, está permitido el uso de bajas dosis de mifepristona (RU-486), un antiprogéstágeno que presenta actividad abortiva pudiendo detener un embarazo en curso.

La eficacia de los AE depende de distintos factores que incluyen principalmente la forma y el momento de su administración: un AE ideal debería ser seguro, accesible, fácilmente administrable y efectivo durante toda la ventana fértil de la mujer (Gemzell-Danielsson y Trussell, 2013). Sin embargo, al día de hoy los mecanismos de acción de todos los métodos existentes no han sido completamente esclarecidos y esto es particularmente importante para aquellos métodos más recientes que suponen una mayor efectividad, tal como ocurre con UPA. UPA ha sido introducido al mercado de más de 50 países en los últimos años y se lo recomienda como tratamiento hormonal de primera línea para anticoncepción de emergencia (Gemzell-Danielsson et al., 2014; Rosato et al., 2015). Si bien la acción antiovulatoria de esta droga ha sido bien estudiada (Stratton et al., 2000; Brache et al., 2010, 2013), no puede descartarse que UPA presente efectos posteriores a la ovulación que aún no hayan sido reconocidos y justifiquen su alta efectividad. Dado que conocer el mecanismo de acción de los métodos anticonceptivos disponibles resulta fundamental para su correcto uso y aceptación, **en el segundo Capítulo de esta Tesis, conforme al objetivo general, nos propusimos esclarecer el mecanismo de acción de UPA, evaluando posibles efectos sobre otros eventos del proceso reproductivo.**

Materiales y métodos

1. Animales

Para los ensayos descritos en esta Tesis, se utilizaron ratones macho adultos (2-6 meses) y hembras prepúberes y adultas (1-4 meses) híbridos (C57BL/6xBALBc)F1, o hembras CF-1, CD1, o deficientes en CAMKII γ (Backs et al., 2010), y hámsters hembras de la cepa Golden Syrian (1-2 meses). Los animales fueron criados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), y de las Universidades de Pennsylvania (UPenn, Filadelfia, PA, EEUU) y Massachusetts (UMASS, Amherst, MA, EEUU). Los animales se mantuvieron a una temperatura de 22-24°C, en presencia de alimento y agua *ad libitum*, con un régimen de 12 horas de luz para los ratones y 14 horas, para los hámsters. En todos los casos, los experimentos con animales fueron realizados bajo las indicaciones de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, EEUU) y los protocolos empleados contaron con la aprobación del Comité de Bioética del IBYME y de los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IBYME, UPenn y UMASS. Aquellos animales sometidos a procedimientos quirúrgicos recibieron analgésicos para minimizar el dolor. En el caso de los ratones, la eutanasia se realizó por dislocación cervical, con excepción de los fetos de 14 días que fueron decapitados. Los hámsters fueron eutanasiados por inhalación de dióxido de carbono.

2. Obtención y capacitación de espermatozoides murinos

Los espermatozoides de ratón se obtuvieron a partir del cauda epididimario. Para ello, machos adultos fueron eutanasiados y se recuperaron sus epidídimos a través de un corte efectuado en la región abdominal. Una vez liberados de grasa y sangre, los caudas epididimarios fueron sometidos a tres incisiones y sumergidos en el medio de Fraser y Drury (Fraser y Drury, 1975), suplementado con 0.3% m/v albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU). Se permitió la dispersión de los espermatozoides en una gota de 300 μ l del medio de incubación bajo aceite mineral por un período de 10 minutos a 37°C y 5% v/v CO₂ (*swim out*). La capacitación fue llevada a cabo en gotas de 300 μ l de medio bajo aceite mineral a una concentración final de 0,1-1.0 x 10⁷ espermatozoides/ml, y las células fueron incubadas por un período de 90 minutos a 37°C y 5% v/v CO₂ en una estufa con gaseo automático.

3. Evaluación del número y la viabilidad de los espermatozoides

El número de espermatozoides fue determinado bajo microscopio óptico utilizando un hemocitómetro. Con el fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides, alícuotas de 10 µl de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C, a las cuales se agregó un volumen de 0.5% m/v de Eosina B (Sigma) en solución fisiológica. A diferencia de los espermatozoides vivos que excluyen el colorante, los espermatozoides muertos lo incorporan y se tiñen de color rosa. El porcentaje de viabilidad se evaluó por microscopía óptica (x400) sobre un mínimo de 100 células.

4. Superovulación de las hembras y obtención de ovocitos maduros

Para la estimulación de la ovulación, las hembras fueron tratadas con una inyección de gonadotrofina coriónica equina (PMSG, Syntex SA, Buenos Aires, Argentina; 5UI para ratones y 30 UI para hámsters) seguida por una inyección de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Syntex; 5UI para ratones y 35 para hámsters) 46-48 horas más tarde. La administración de cada hormona se realizó entre las 18:00 y 18:30 hs cada vez, a menos que se especifique lo contrario.

Para obtener ovocitos maduros, los oviductos fueron disecados 14-15 horas luego de la administración de hCG y la región ampular fue desgarrada mediante una pequeña incisión en medio de cultivo para permitir la salida de los complejos cúmulus-ovocito (COCs). Los COCs de ratón fueron colectados en medio Whittens/HEPES/PVA (Cold Spring Harbor, 2009) para los ensayos de activación partenogenética o en medio de Fraser y Drury para los ensayos de fertilización *in vitro*. Los COCs de hámster fueron colectados en medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW; Biggers, 1971) para el ensayo de HOPT (ver Sección 21.b).

Para la disgregación del *cumulus oophorus*, los COCs fueron incubados en presencia de hialuronidasa (tipo IV, Sigma; 0.03 ó 0.1% m/v para ratón o hámster, respectivamente) durante 5 minutos a 37°C.

Para la disolución de la ZP, los ovocitos de ratón fueron incubados en solución ácida de Tyrode (pH 2.5) durante 10-20 segundos (Nicolson et al., 1975), mientras que los de hámster fueron tratados con tripsina 0.1% m/v (Sigma).

Luego de cada tratamiento los ovocitos fueron lavados en el medio de cultivo correspondiente y utilizados para los diferentes ensayos. En todo momento, los ovocitos desprovistos de cúmulus fueron manipulados por aspiración y los procedimientos realizados bajo una lupa estereoscópica (Nikon, Tokio, Japón).

5. Obtención de ovocitos inmaduros de ratón

Para la colección de ovocitos inmaduros (en estadio de vesícula germinal), las hembras fueron estimuladas con PMSG (5 UI) y 46-48 horas más tarde se disecaron los ovarios. Los mismos fueron colocados en solución Tyrode-Lactato con HEPES (TL-HEPES) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5% (Gibco, GGrand Island, NY) e isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma) 100 μ M y sometidos a repetidas punciones con una aguja 27-gauge de forma de romper los folículos ováricos. Los COC fueron colectados, el cúmulus fue disgregado en forma mecánica por pipeteo y los ovocitos desnudados fueron incubados en medio Chatot, Ziomek y Bavister (CZB; Chatot et al., 1989) con polivinilalcohol (PVA, Sigma) 0.1% m/v a 37°C y 5% v/v CO₂. Para asegurar el arresto meiótico de los ovocitos en Profase I los mismos fueron incubados con IBMX 100 μ M.

6. Evaluación del ciclo estral de las hembras

El estadio del ciclo estral en ratones fue determinado cada mañana a través del análisis de extendidos vaginales. Las células epiteliales de la vagina fueron colectadas en 30 μ l de buffer fosfato (PBS), transferidas a portaobjetos y examinadas bajo microscopio óptico. Los diferentes estadios (proestro, estro, metaestro y diestro) fueron clasificados según la proporción de los distintos tipos celulares (leucocitos y células epiteliales cornificadas o nucleadas) (Caligioni, 2009).

7. Obtención de ovocitos de ratón fertilizados *in vivo*

Hembras adultas en proestro fueron superovuladas tal como se describió en la Sección 4 y puestas en apareo con machos de fertilidad probada por un período corto alrededor del horario en que ocurriría la ovulación (40 minutos, de 6:20 a 7:00 hs el día posterior a la administración de hCG). Siete horas después de verificada la presencia de tapón vaginal, se colectaron los ovocitos del oviducto tal como se describió previamente. Los ovocitos fueron luego teñidos con Hoescht 33342 (Sigma, 10 µg/ml) durante 10 minutos para teñir el ADN, lavados y examinados en un microscopio epifluorescencia (Nikon Optiphot). Se consideraron fertilizados aquellos ovocitos que presentan cabezas espermáticas descondensadas en el citoplasma.

8. Activación partenogenética de los ovocitos de ratón

Ovocitos sin ZP fueron lavados en medio de Fraser y Drury e incubados con alguno de los siguientes compuestos para inducir su activación: SrCl₂ (Sigma) 10mM en medio sin calcio extracelular por 1 hora; TPEN (Sigma) 100 µM por 1 hora; ionóforo de calcio A23187 (Sigma) 5-10 µM en medio sin calcio extracelular por 5 minutos ó 10 µM en medio con calcio extracelular por 1 minuto; etanol (Merck, Darmstadt, Germany) 7% v/v por 5 minutos; 2-aminofenilborato (2-APB, Sigma) 200 µM por 30 minutos; timerosal (Sigma) 50 µM en medio con calcio extracelular por 1 hora. Luego fueron lavados e incubados por 1 hora adicional en medio completo.

Para evaluar el efecto de la remodelación del citoesqueleto de actina durante la activación partenogenética, los ovocitos fueron preincubados durante 1 hora con Citocalasina D (CytD, Sigma) 10 µM o Jasplakinolide (Jas, Sigma) 500 µM y los inhibidores incluidos durante el resto del experimento.

9. Marcación de fosfatidilserina (PS) externalizada y ADN en ovocitos

Para detectar la exposición de PS en ovocitos murinos, los mismos fueron incubados por una hora con una dilución 1:20 de Anexina-V acoplada a FITC (ANX5-FITC, BD Biosciencias, San Diego, CA, EEUU) y fijados en paraformaldehído (PFA, Sigma) 3.7% m/v

en PBS. En los casos de activación partenogenética, la ANX5-FITC se agregó durante la última hora de incubación. Los ovocitos fueron montados con Vectashield (Vector) en presencia de Hoechst 33342 10 µg/ml para teñir el ADN. En los casos en que el microscopio utilizado no contaba con los filtros para Hoechst 33342, se empleó TO-PRO 3 (Life Technologies) 1 µM. Los ovocitos fueron luego examinados por microscopía de epifluorescencia (Nikon Optiphot) o confocal (Nikon D-Eclipse C1, Nikon A1 Spectral o Leica TCS SP). La cuantificación de la magnitud de PS expuesta se realizó tal como se indica en la Sección 13 (Captura y análisis de imágenes).

10. Detección del contenido y el exudado de gránulos corticales (GC)

Para la detección del contenido de GC, los ovocitos fueron fijados por 1 hora en PFA 3.7% m/v, permeabilizados con Tritón X-100 (JT Baker Chemicals, Phillipsburg, NJ, EEUU) 0.1% v/v en PBS con BSA 0.3% m/v (PBS-BSA3) por 15 minutos y lavados con Tween-20 (Sigma) 0.01% v/v en PBS-BSA3. Finalmente se los incubó por 30 minutos en presencia de 25 µg/ml *Lens culinaris* agglutinin (LCA), conjugada a TRITC (LCA-TRITC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU), lectina que une el contenido cortical.

Para la marcación del exudado cortical, los ovocitos vivos fueron expuestos a 25 µg/ml LCA-TRITC durante los últimos 15 minutos del correspondiente tratamiento. Para los ensayos de co-localización con ANX5-FITC, se empleó como lectina fluorescente una LCA acoplada a DyLight 649 (LCA-DyLight 649, Vector), para evitar interferencia con la emisión de FITC. Es importante destacar que la marcación del exudado por ambas formas fluorescentes de LCA resultó similar en ovocitos controles activados con Sr^{2+} . La cuantificación de la exocitosis cortical se realizó tal como se indica en la Sección 13 (Captura y análisis de imágenes).

11. Marcación de F-actina en ovocitos

Los ovocitos fueron fijados por 1 hora en PFA 3.7% m/v, permeabilizados con Tritón X-100 0.1% v/v en PBS-BSA3 por 15 minutos e incubados con Faloidina-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) 66 nM o Faloidina Acti-stain 488 (Cytoskeleton, Denver, CO, EEUU) 16 nM en PBS-BSA3 con Tween-20 0.01% por 30 minutos. Los ovocitos fueron lavados y

montados con Vectashield y Hoechst 33342, y examinados por microscopía de epifluorescencia (Nikon Optiphot) o confocal (Nikon A1 Spectral).

12. Ensayos de pulso y caza

Para detectar la internalización de material exocítico, ovocitos sin ZP se incubaron 15 minutos con Sr^{2+} 10 mM en medio Whittens/HEPES/PVA sin calcio extracelular (estímulo) y se marcaron con 25 $\mu\text{g/ml}$ LCA-TRITC o LCA-DyLight 649 por 30 minutos a 4°C (pulso), seguido por una caza en medio completo a 37°C. A continuación los ovocitos fueron fijados por 45 minutos en PFA 3.7% m/v en PBS, montados con Vectashield y Hoechst 33342 y examinados con un microscopio confocal (Nikon A1 Spectral, Nikon D-Eclipse C1 u Olympus IX83 con módulo DSU). En paralelo, algunos ovocitos fueron fijados luego del pulso para determinar la magnitud de la exocitosis cortical. Para la determinación de la cantidad de marca internalizada luego del pulso, se adquirieron 15-20 imágenes por ovocito cada 1 μm de distancia alrededor del plano de mayor diámetro.

Este protocolo fue repetido con las siguientes modificaciones:

- Como control inhibitorio para fenómenos endocíticos la caza se realizó a 4°C.
- Para ensayos en presencia de inhibidores de endocitosis compensatoria (EC), Staurosporina (Stp, Abcam, Cambridge, MA, EEUU) 25nM o Ciclosporina A (CsA, Abcam) 1 μM se agregaron durante una preincubación de 15 minutos y los pasos subsiguientes del estímulo, el pulso y la caza.
- Los inhibidores CytD 10 μM , Latrunculina A (LatA, Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) 10 μM , PitStop 2 (Abcam) 15 μM , Filipina (Sigma) 5 μM , y Dynasore (Sigma) 80 μM se adicionaron durante el pulso y la caza.
- Cuando se emplearon espermatozoides a modo de estímulo, los ovocitos fueron co-incubados por 15 minutos con espermatozoides capacitados, en una concentración final de $0,5-1 \times 10^4$ células/ml en medio de Fraser y Drury con atmósfera 5% v/v de CO_2 . Luego se continuó con el pulso y la caza en el mismo medio.

- El estímulo con ionóforo de calcio A23187 se realizó durante 5 minutos en una concentración 10 μ M en medio sin calcio, y posterior incubación en medio sin la droga por 10 minutos adicionales. Luego se continuó con el pulso y la caza tal como se describió previamente.

13. Captura y análisis de imágenes

Las imágenes de los ensayos de exposición de PS, de exocitosis cortical y de pulso y caza fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia (Nikon Optiphot) o confocal (Nikon D-Eclipse C1, Nikon A1 Spectral, Leica TCS SP u Olympus IX 83 con módulo DSU). Los microscopios confocales fueron empleados principalmente para los ensayos donde fue necesario evaluar la co-localización de sondas o realizar cuantificaciones. El uso de distintos modelos se debió principalmente a su disponibilidad en los distintos lugares donde se llevaron a cabo los experimentos (IBYME, UPenn o UMASS). Para cada ensayo, las imágenes fueron obtenidas de un mismo microscopio y se verificó que la respuesta de los ovocitos controles fuera similar a la observada en experimentos previos.

En todos los casos las imágenes fueron analizadas con el software FIJI (Schindelin et al., 2012). Para los ensayos de co-localización de ANX5-FITC y LCA-DyLight 649, la cuantificación se llevó a cabo sobre al menos dos planos focales por ovocito utilizando “*colocalization test*”. Para la cuantificación de la exocitosis cortical, se determinó la intensidad de fluorescencia en la membrana de los ovocitos por unidad de área. Para la selección de la región de interés (ROI), no se tuvo en cuenta las regiones libres de GC (zona que recubre el huso meiótico). La cuantificación fue realizada en un plano focal por ovocito. De manera similar, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de ANX5-FITC en la membrana de ovocitos microinyectados como una medida de la cantidad de PS expuesta.

14. Medición de calcio en ovocitos de ratón

Los ovocitos sin ZP fueron incubados con la sonda sensible a calcio Fura-2 acetoximetiléster (Fura-2 AM, Invitrogen) 1.25 μ M suplementado con ácido plurónico (Invitrogen) 0.02% por 20 minutos a temperatura ambiente en medio TL-HEPES con SFB. Luego fueron lavados en forma exhaustiva en medio sin SFB carente de calcio y ubicados

en placas de Petri con fondo de vidrio (Mat-Tek Corp., Ashland, MA, EEUU) en medio bajo aceite mineral. Los valores de calcio intracelular fueron monitoreados usando un microscopio de epifluorescencia (Nikon) ajustado para registros temporales de fluorescencia y con platina termostatzada a 37°C. Cada ovocito fue seleccionado como ROI, pudiendo analizar en forma simultánea entre 8-12 ovocitos. Se determinó la intensidad de fluorescencia (emisión 510 nm) por excitación a 340 y 380 nm cada 20 segundos y los niveles de calcio fueron determinados indirectamente como el ratio 340/380. Luego de 10 minutos de registros, se adicionó SrCl_2 a una concentración final de 10 mM y el monitoreo se continuó por al menos una hora adicional.

15. Subclonado de *Plscr1*

Todos los plásmidos utilizados en esta Tesis fueron gentilmente donados: los vectores de origen pEGFP-C2 conteniendo *Plscr1* salvaje (WT) o mutada (Mut) por los Dres. Ory y Gasman (Estrasburgo, Francia); el plásmido Venus-N-pCDNA6B por el Dr. Fissore (Umass Amherst, EEUU); y el plásmido pIVt-kozak-3xflag por el Dr. Schultz (UPenn, Filadelfia, EEUU). Todos ellos fueron resuspendidos en buffer Tris-EDTA y se determinó su concentración por espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop (Thermo Scientific).

Se utilizaron los plásmidos para transformar bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH5 α por golpe térmico utilizando protocolos estandarizados (Froger 2007). Se obtuvieron colonias aisladas de las bacterias transformadas para cada plásmido, crecidas en LB-Ágar en presencia de Kanamicina (para pEGFP-C2) o Ampicilina (para Venus-N-pCDNA6B y pIVt-kozak-3xflag), según correspondiera, a partir de las cuales se realizaron cultivos líquidos. Luego de su amplificación, el ADN plasmídico fue extraído mediante un kit comercial (Wizard Plus SV Minipreps, Promega, Madison, WI, EEUU) y se determinó su concentración por espectrofotometría.

Para realizar los subclonados, en primer lugar los plásmidos fueron digeridos con endonucleasas de restricción según las indicaciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) en un volumen final de 100 μl , utilizando 5-10 μg de plásmido en cada caso. En cada caso, los plásmidos se cortaron con las siguientes enzimas de restricción:

Plásmido	Enzimas de restricción	Condiciones
pEGFP-C2 + <i>Plscr1</i> WT	BglII y EcoRI	2h a 37°C
pEGFP-C2 + <i>Plscr1</i> Mut	BglII y EcoRI	2h a 37°C
Venus-N-pCDNA6B	Sall	2h a 37°C
pIVt-kozak-3xflag	BamHI	2h a 37°C

De esta forma, se generaron, por un lado, las secuencias libres de *Plscr1* WT o Mut, y por otro, los vectores de destino abiertos. A continuación, se generaron extremos romos por adición del fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I (concentración final 1 u/μg de ADN) en presencia de dNTPS 33 μM y posterior tratamiento por 20 minutos a 75°C. Los plásmidos Venus-N-pCDNA6B y pIVt-kozak-3xflag fueron finalmente incubados con la fosfatasa alcalina CIP (10 u, 30 minutos a 37°C) para desfosforilar los extremos, evitando la posterior religación de los mismos. Los fragmentos digeridos (secuencias de *Plscr1* y plásmidos de destino abiertos) fueron a continuación purificados a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial QIAquick (QIAGEN, Valencia, CA, EEUU) y utilizados en diferentes proporciones vector:inserto para su posterior ligación. La misma se realizó con la ligasa T4 por una noche a 16°C.

Los productos de ligación fueron utilizados para transformar bacterias competentes tal como se describió previamente y a partir de colonias aisladas se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para colonias bacterianas tal como se describe en la Sección 16. A partir de aquellas bacterias que contuvieran el inserto se procedió a un mapeo de restricción con la endonucleasa NcoI, que libera fragmentos de distintos tamaños según el sentido en el que se encuentra el inserto en el plásmido de destino, y aquellas que correspondían al sentido correcto fueron secuenciadas en forma automática por la empresa Macrogen (Seúl, Korea) para confirmar la ausencia de errores en la secuencia. El ADN plasmídico se purificó como se mencionó previamente.

16. Análisis de la presencia de *Plscr1* en plásmidos

a. Extracción de ADN bacteriano

Luego de la obtención de colonias individuales, se tomó una pequeña porción de cada una, la cual fue resuspendida en 20 μl de agua. Por un lado, 2 μl se sembraron en una

nueva placa de LB-Agar suplementado con antibiótico de forma de conservar réplicas de esa colonia, y el resto se sometió a hervor por 10 minutos para lisar las bacterias. Luego de una centrifugación por 5 minutos a 8000 g, se tomó el sobrenadante para ser utilizado posteriormente como molde de la PCR.

b. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción fue realizada en un buffer conteniendo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (Promega), 1.0 µM de cada primer específico y 1 u de la polimerasa GoTag (Promega) en un volumen final de 20 µl (pH=8.5). Se agregó en cada caso 2.5 µl de ADN extraído de colonias bacterianas o 10 ng de ADN plasmídico. Las secuencias de los primers utilizados fueron:

1) hPlscr1 Fwd: 5'-AACTCACAGATGAATGCTTCTCAC-3'

2) hPlscr1 Rv: 5'-CCACACTCCTGATTTTTGTTCC-3'

3) mPlscr1 Fwd: 5'-ATGGAAAACCACAGCAAGCA-3'

4) mPlscr1 Rv: 5'-TTACTGCCATGCTCCTGATCT-3'

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C, 1 minuto 15 segundos a 72°C y extensión final por 7 minutos a 72°C.

El tamaño esperado para los fragmentos era de 987pb (*mPlscr1*) y 945pb (*hPlscr1*). En todos los casos, el resultado de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% m/v y tinción con bromuro de etidio (0.02 mg/ml).

17. Obtención de ARN

Para la obtención de ARN para su posterior microinyección, los plásmidos de destino conteniendo los insertos WT o Mut fueron linealizados. Para ello, los vectores Venus-N-pCDNA6B + *Plscr1* y pIVt-kozak-3xflag + *Plscr1* se incubaron con las endonucleasas AgeI y PvuI, respectivamente, (5-10 µg de plásmido en volumen final de 100 µl, 5h 37°C) y se monitoreó la correcta escisión por corrida electroforética en gel de agarosa 0.9% m/v.

El ADN del producto de reacción fue purificado y empleado para la posterior transcripción *in vitro* utilizando el kit comercial mMMESSAGE mMACHINE (Life technologies, Carlsbad, CA, EEUU) con la enzima T7 ARN polimerasa. En el caso del vector Venus-N-pCDNA6B, se realizó además la poliadenilación del ARN con un kit comercial (Invitrogen). En ambos casos el ARN resultante se trató con DNAasa, se purificó con el kit MEGAClear (Ambion, Austin, TX, EEUU) y por posterior precipitación con etanol, y se resuspendió en agua libre de nucleasas a concentración de 1 µg/µl. La solución resultante se alícuotó en varios tubos los cuales fueron almacenados a -80°C hasta el día del experimento.

18. Microinyección de ARN en ovocitos de ratón

La micromanipulación de ovocitos se realizó utilizando manipuladores Narishige (Medical Systems Corp., Great Neck, NY) acoplados a un microscopio Nikon Diaphot.

Los ovocitos con ZP se mantuvieron en una gota de 50 µl de TL-HEPES y SFB 5% bajo aceite mineral. Para las inyecciones de ovocitos inmaduros, el medio fue suplementado con IBXM 100 µM, mientras que los ovocitos ovulados (MII) se incubaron en presencia de sacarosa (Sigma) 2.5% m/v. Todos los medios empleados fueron filtrados nuevamente justo antes de la microinyección a través de un poro de 0.22 µm.

Para la microinyección, el ARN debió ser primero desnaturalizado. Para ello, se lo descongeló en hielo, se expuso por 3 minutos a 95°C, se enfrió nuevamente por 30-40 segundos y finalmente se centrifugó por 10 minutos a 14000 g. El sobrenadante fue diluido con agua libre de nucleasas a la concentración deseada, en general, 0.5 µg/µl. Las micropipetas de vidrio fueron cargadas por succión de una gota conteniendo el ARN. Las soluciones fueron expulsadas dentro del citoplasma de los ovocitos por presión neumática (PLI-100 picoinjector; Medical Systems Corp.). El volumen de inyección fue 5–10 pl, resultando así la concentración final intracelular del ARN de aproximadamente 1-2% de la concentración inicial (Wakai et al., 2013).

Luego de la microinyección, los ovocitos fueron lavados e incubados por diferentes tiempos en CZB a 37°C y 5% v/v CO₂. Los ovocitos inmaduros se mantuvieron arrestados en presencia de IBMX.

19. Análisis de la expresión de *Tmem16f* en ovocitos

a. Extracción de ARN

Para la evaluación de la expresión de *Tmem16f*, se extrajo ARN de ovocitos y de riñón (utilizado como control positivo). En el primer caso, el ARN fue extraído a partir de 180 ovocitos maduros libres de células del cúmulus empleando el kit RNAqueous-Micro (Ambion), siguiendo las recomendaciones y condiciones establecidas por el proveedor. Para el segundo caso, el ARN se extrajo con TRIzol® (Gibco, BRL, Rockville, MD, EEUU), siguiendo las instrucciones del proveedor.

b. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El ADNc de ovocitos y riñón se obtuvo por transcripción reversa utilizando 1-2 µg de ARN como molde, 2.5 µM de oligo dT (oligonucleótido 2-desoxitimidina; Biodynamics) en lugar de primers, 0.3 mM de dNTPS, 80 u de inhibidor de RNAasas (rRNasin; Promega) y 300 u de retrotranscriptasa (Promega). El volumen final fue de 20 µl. La mezcla de reacción fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 1 hora a 35°C, y finalmente 5 minutos a 95°C. Como control negativo, se empleó agua como molde o se realizó la reacción sin la retrotranscriptasa (-RT).

La PCR para detectar *Tmem16f* fue realizada en una mezcla de reacción tal como se describió en la Sección 16, utilizando 1 µl de ADNc como molde, y empleando los siguientes primers:

Fwd: 5'-GGAGAATCAGCAGGACTTCAGG-3'

Rv: 5'-CTCTGGCTTGATGACACTCTCG -3'

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C y extensión final por 7 minutos a 72°C. El resultado de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% m/v y tinción con bromuro de etidio (0,02 mg/ml).

20. Obtención y capacitación de espermatozoides humanos

Los espermatozoides humanos se obtuvieron de muestras de semen de donantes sanos cuyas características seminales concordaban con el criterio de normalidad de la OMS (OMS, 2010). En todos los casos, se solicitó un período de abstinencia sexual (2-5 días) previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado. La muestra de semen fue procesada dentro de la primera hora luego de su obtención. La evaluación de la motilidad espermática en semen fue realizada de forma subjetiva bajo microscopio óptico según las indicaciones de la OMS (OMS, 2010). El conteo espermático se realizó utilizando un hemocitómetro y la viabilidad se analizó tal como se describió en la Sección 3 (Evaluación del número y la viabilidad de los espermatozoides).

Los espermatozoides humanos fueron seleccionados mediante la técnica de *swim-up*. Para ello, luego de la licuefacción, el semen fue colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio BWW con BSA 2,6% m/v e incubado durante 1 hora a 37°C y 5% v/v CO₂ en una estufa con gaseo automático. Los espermatozoides móviles fueron recuperados de la fracción superior del medio luego de 1 hora, lavados y resuspendidos a una concentración final capacitante de 0,5-1,0 x 10⁷ células/ml en BWW. Los espermatozoides fueron capacitados durante 18 horas.

21. Ensayos de interacción de gametas con espermatozoides humanos

a. Ensayo de penetración del cúmulus de ratón

Espermatozoides humanos capacitados en presencia o ausencia de 1000 ng/ml de UPA (HRA Pharma, París, Francia) fueron teñidos con Hoescht 33342 (3 µg/ml concentración final) durante 10 minutos en BWW y lavados una vez con medio. Alícuotas de 100 µl de medio conteniendo 10-15 COCs de ratón fueron inseminados con 1 x 10⁴ espermatozoides pre-teñidos. Las gametas fueron co-incubadas a 37°C y 5% v/v CO₂ en presencia o ausencia de UPA (1000 ng/ml) durante 15 minutos, tras los cuales los COCs fueron fijados con PFA 2% m/v, lavados con PBS y observados en un microscopio epifluorescencia (Nikon Optiphot). Para cada COC se determinó el número total de espermatozoides dentro de la matriz del cúmulus por cuantificación del número de cabezas fluorescentes (Battistone et al., 2014).

b. Ensayo de penetración de ovocitos de hámster (HOPT, *hamster oocyte penetration test*)

El HOPT fue realizado según se describe en el Manual de Laboratorio para la evaluación de semen humano (OMS, 2010). Espermatozoides humanos capacitados en presencia o ausencia de 1000 ng/ml de UPA se utilizaron para inseminar alícuotas de 100 µl de BWW conteniendo 10-15 ovocitos de hámster sin ZP ($2-3 \times 10^5$ espermatozoides móviles por gota). La co-incubación de gametas se realizó durante 2.5 horas en presencia o ausencia de UPA (1000 ng/ml). Al cabo de ese período, los ovocitos fueron lavados para remover los espermatozoides no unidos o débilmente unidos, fijados en glutaraldehído (JT Baker) 2.5% v/v y montados en portaobjetos. Para la observación de los ovocitos, los mismos fueron teñidos con una solución de acetocarmin al 1% m/v, con el fin de colorear el ADN. Los ovocitos fueron observados en el microscopio óptico, determinándose la presencia de espermatozoides unidos y penetrados para cada ovocito. Se consideraron ovocitos penetrados aquellos que presentaron cabezas descondensadas o pronúcleos, y colas de espermatozoides en el citoplasma.

22. Evaluación de la reacción acrosomal de espermatozoides murinos

La inducción de la reacción acrosomal se realizó por exposición de los espermatozoides de ratón a progesterona (Sigma) 15 µM durante los últimos 15 minutos de la capacitación. Los espermatozoides fueron recuperados y fijados en PFA 4% m/v en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavados 3 veces con acetato de amonio 0.1 M pH 9, por centrifugación, y extendidos sobre portaobjetos, los cuales fueron luego lavados por inmersión sucesiva en agua, metanol y agua (5 minutos en cada uno), y posteriormente incubados durante 5 minutos en una solución de 0.22% m/v Coomassie Brilliant Blue en 50% v/v metanol y 10% v/v ácido acético. Luego, los portaobjetos fueron lavados con agua y examinados inmediatamente bajo el microscopio óptico (x400). Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y como reaccionados cuando esa región no presentaba color (Da Ros et al., 2008).

23. Ensayos de interacción de gametas con espermatozoides murinos

Espermatozoides murinos capacitados en presencia o ausencia de UPA (10-1000 ng/ml) se utilizaron para inseminar alícuotas de 50 µl de medio de Fraser y Drury conteniendo COCs u ovocitos sin cúmulus (10-20). Se utilizó una concentración final de espermatozoides en la gota de co-incubación de $5-6 \times 10^5$ células/ml. Las gametas fueron co-incubadas a 37°C y 5% v/v CO₂ en presencia o ausencia de UPA. Luego de 5 horas de incubación los ovocitos fueron lavados de los espermatozoides y células del cúmulus, y 15 horas más tarde se determinó el porcentaje de clivaje a 2 células como criterio de fertilización.

24. Desarrollo embrionario de ovocitos fertilizados *in vivo*

Se utilizó el siguiente esquema de apareo para obtener cigotas de ratón de buena calidad. Hembras prepúberes fueron sometidas al protocolo de superovulación (PMSG 17:00 hs, seguida de hCG 46 horas más tarde, 15:00 hs) y, el día de la administración de hCG, puestas en apareo con un macho fértil por una noche. La mañana siguiente se determinó el éxito del apareo por presencia de tapón vaginal y se recuperaron las cigotas en medio KSOM (Erbach et al., 1994). Los embriones fueron transferidos a gotas de 50 µl de KSOM fresco en presencia o ausencia de UPA (1000 ng/ml) e incubados por 4 días a 37°C y 5% v/v CO₂. Diariamente se monitoreó el desarrollo de los embriones por los distintos estadios (2, 4 y 8 células, mórula o blastocisto) bajo una lupa estereoscópica (Nikon).

25. Ensayos *in vivo* con UPA

a. Preparación de UPA

Para los ensayos que se describen a continuación, UPA fue pesado individualmente para cada hembra teniendo en cuenta el peso del animal y la dosis necesaria de la droga. UPA se disolvió en aceite de sésamo el día de la administración por calentamiento a 60°C y agitación con vortex. La droga fue inyectada a los ratones en una concentración de 10 ó 40 mg/kg de peso corporal en forma intraperitoneal, en un volumen final de 100 µl. La dosis

más alta utilizada corresponde a la ya reportada que presenta un efecto inhibitorio de la ovulación en ratón (Palanisamy et al., 2006). Las hembras control en cada caso recibieron el mismo volumen del vehículo (aceite de sésamo).

b. Efecto de UPA sobre la ovulación

Las hembras fueron sometidas al protocolo de superovulación y se administró UPA (40 mg/kg de peso corporal) o vehículo simultáneamente junto con la hCG. Se determinó el número de ovocitos colectados de la *ampulla*.

c. Efecto de UPA sobre la fertilización *in vivo*

Se realizó un protocolo similar al descrito en la Sección 7 (Obtención de ovocitos fertilizados *in vivo*). En este caso, justo antes o justo después del apareo corto de 40 minutos se administró UPA (40 mg/kg de peso corporal) o vehículo. Tal como se describió previamente, los ovocitos recuperados fueron teñidos con Hoescht 33342 y observados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot).

d. Efecto de UPA sobre eventos post-fertilización

Hembras adultas en estadio de proestro fueron puestas en apareo con machos fértiles y el éxito del apareo se determinó por presencia de tapón vaginal (día embrionario 0.5: E0.5). El día E1.5 o E2.5 se administró UPA (10 ó 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo y en los días subsiguientes se realizaron diferentes procedimientos sobre distintos grupos experimentales para evaluar el efecto de la droga sobre los eventos post-fertilización. Estos protocolos se describen a continuación:

i. Evaluación de la preñez

El día E14.5 las hembras fueron eutanasiadas y los cuernos uterinos y los ovarios fueron disecados cuidadosamente. Se determinó el número de fetos en desarrollo y el número de cuerpos lúteos en ovario bajo lupa estereoscópica como indicador del número

de ovocitos ovulados en el ciclo correspondiente. En este día de la preñez, los ovarios de ratón ya no cuentan con cuerpos lúteos de ciclos estrales anteriores y aquellos producto de la ovulación en el ciclo de la preñez ya han alcanzado su diámetro máximo, lo que los hace fácilmente detectables (Greenwald y Rothchild, 1968).

ii. Detección de sitios de implantación tempranos

El día E5.5 (un día después de la implantación), se inyectó a las hembras 100 µl de Azul de Evans (Sigma) al 1% m/v en solución fisiológica por vía intravenosa. Los animales fueron eutanasiados 10 minutos después y se disecaron los úteros. Este colorante se acumula en los sitios de aposición de los blastocistos, dando lugar a bandas azules, las cuales fueron cuantificadas (Deb et al., 2006).

iii. Obtención de embriones preimplantatorios

El día E3.5, los cuernos uterinos y los oviductos fueron cuidadosamente disecados y lavados con medio KSOM bajo la lupa estereoscópica con una aguja 27- ó 31-gauge respectivamente. Se determinó el número de embriones recolectado de cada órgano y su estadio de desarrollo (mórula o blastocisto).

iv. Procesamiento histológico de los cuernos uterinos

El día E3.5 las hembras fueron eutanasiadas y los cuernos uterinos fueron disecados y fijados inmediatamente en una solución de formaldehído 4% m/v en PBS. Los órganos fueron luego incluidos en parafina, cortados en micrótomos en secciones de 5 µm de espesor y montados en portaobjetos. Finalmente, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico. El análisis histológico fue realizado por una patóloga ginecológica.

v. Inducción de la decidualización artificial

El útero murino puede sufrir la reacción decidual artificial solamente si la hembra ha recibido un estímulo cervical, desencadenando la pseudopreñez. Por lo tanto, el siguiente experimento fue realizado con hembras apareadas con machos vasectomizados.

La vasectomía se realizó al menos dos semanas antes de los ensayos en machos de fertilidad probada, por remoción quirúrgica bajo anestesia de una porción de 1 cm de cada *vas deferens* (Nagy et al., 2003).

Los apareos de hembras adultas en proestro y machos vasectomizados fueron realizados por una noche, y tres días luego de la detección del tapón vaginal (E3.5) se indujo la decidualización artificial tal como se describe a continuación (Deb et al., 2006). Para ello, las hembras fueron anestesiadas y se realizó una incisión en la región dorsal derecha, permitiendo la exposición del cuerno uterino. En la sección del cuerno más proximal al oviducto se administraron 20 μ l de aceite de sésamo empleando una aguja 27-gauge. El pasaje del líquido dentro del lumen uterino se monitoreó bajo lupa estereoscópica (Nikon). El cuerno contralateral (izquierdo) no se inyectó y fue utilizado como control. El día E7.5, se disecó el tracto reproductor de cada hembra y se determinó el peso de cada cuerno uterino y el aumento relativo del inyectado respecto al control.

Análisis estadístico

En todos los casos, los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism (San Diego, CA, EEUU). Para cada conjunto de datos, se condujo el test de normalidad de Shapiro-Wilk y se consideró que aquellos con un valor de $p < 0.05$ no tenían distribución normal. En estos casos, los valores se presentan como mediana con rango intercuartil, y la significancia estadística fue analizada por el test de Mann-Whitney U o el test de Kruskal-Wallis para realizar comparaciones entre dos o más grupos, respectivamente. El test de Mann-Whitney U se utilizó para evaluar el número de sitios de implantación el día E14.5, el porcentaje de embriones normales y el grado de decidualización en el Capítulo II. El test de Kruskal-Wallis se empleó para evaluar el número de sitios de implantación tempranos en el Capítulo II. El resto de los datos, que presentaban valores de $p > 0.05$ en el test de

normalidad, se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Para comparaciones entre dos grupos, la significancia estadística se analizó con t de Student: para la marca total internalizada en ensayos de pulso y caza y el grado de exocitosis cortical en el Capítulo I, y para el porcentaje de embriones en cada estadio cada día, el número de ovocitos ovulados, el número de cuerpos lúteos, el número de embriones preimplantatorios recuperados y el porcentaje en estadio de blastocisto en el Capítulo II. En el Capítulo I, en aquellos casos en los que la marca internalizada en ensayos de pulso y caza se relativizó al control, se evaluó si los intervalos de confianza de 95% correspondientes a los tratamientos contenían el valor 1 (igual al control). El test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con el post-test de Tukey fue utilizado en el Capítulo II para el ensayo de penetración de cúmulus murino, el ensayo de HOPT, los porcentajes de fertilización *in vitro* e *in vivo*. Para los siguientes casos, se empleó el test de ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni: parámetros de activación de ovocitos microinyectados (Capítulo I) y porcentaje de reacción acrosomal (Capítulo II). En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0.05$.

Capítulo I

**Estudio de la movilización de fosfatidilserina en el ovocito fertilizado
de ratón y su relevancia para la activación del desarrollo**

INTRODUCCIÓN

Los lípidos de membrana

Por muchos años se postuló que los lípidos tenían sólo funciones estructurales en las membranas biológicas. Sin embargo, hoy en día se sabe que cumplen múltiples roles funcionales incluyendo eventos de tráfico de membrana, de señalización y de regulación celular (Spector y Yorek, 1985; Simons y Sampaio, 2011; De Craene et al., 2017).

Los fosfolípidos forman el núcleo estructural de las membranas y las subdividen en compartimentos con diferentes identidades tanto estructurales como funcionales, confiriéndoles propiedades dieléctricas, permeabilidad y fluidez únicas (Forrester et al., 2004). En células de mamíferos, los glicerofosfolípidos representan aproximadamente el 70% del contenido lipídico, mientras que el resto está compuesto principalmente por colesterol, esfingomielina y glicoesfingolípidos. De los glicerofosfolípidos presentes en membrana, el 40-50% corresponde a la fosfatidilcolina, el 20-45% a la fosfatidiletanolamina, el 10-20% a la fosfatidilserina (PS), y en forma minoritaria se encuentran el fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico (Leventis y Grinstein, 2010).

La composición fosfolipídica es característica y diferente según el tejido o tipo celular, e incluso entre distintas organelas dentro de una misma célula (Leventis y Grinstein, 2010). Más aún, la composición es diferente en cada una de las caras de una misma bicapa, siendo asimétrica la distribución de fosfolípidos en la membrana plasmática de la mayoría de las células: mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielina se encuentran enriquecidas en la cara externa, los aminofosfolípidos PS y fosfatidiletanolamina se encuentran enriquecidos en la cara citoplasmática (Van Meer et al., 2008).

La fosfatidilserina (PS)

A pesar de que PS no es el fosfolípido más abundante, su importancia fisiológica es muy significativa y es atribuida a sus propiedades físicas y bioquímicas únicas. Además de las dos cadenas de ácidos grasos unidas a glicerol que conforman la fracción hidrofóbica del fosfolípido, PS posee como residuo polar una serina unida al grupo fosfato a través de

una unión fosfodiéster. Dado que la serina es un residuo neutro, la carga neta de PS es negativa, a diferencia de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina que son fosfolípidos neutros (Fig. 1.1) (Leventis y Grinstein, 2010). Debido a esto, al concentrarse PS en una de las caras de la bicapa, contribuye al potencial electrostático de la misma facilitando el reclutamiento de cationes solubles y agrupaciones proteicas cargadas positivamente (Stace y Ktistakis, 2006; Yeung et al., 2008, 2009).

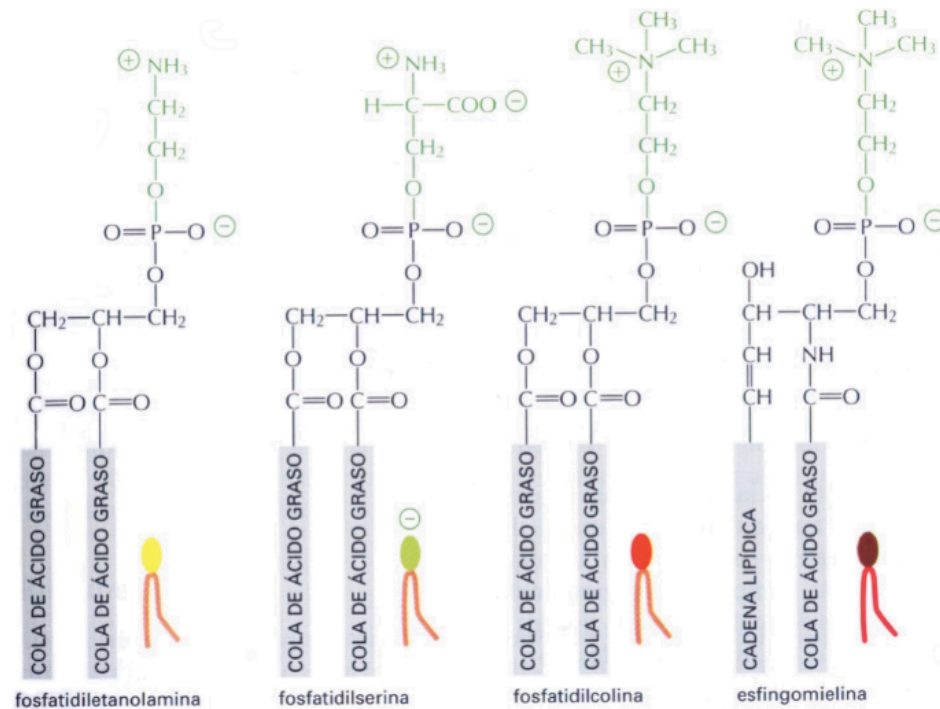


Figura 1.1. Estructura química de fosfolípidos presentes en las membranas biológicas. Se representa la estructura de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina y esfingomielina. Están formados por glicerol unido a dos cadenas lipídicas y un residuo polar a través de una unión fosfodiéster. En el caso de PS, el residuo (serina) es neutro y resulta en que su carga neta sea negativa.

La distribución asimétrica de PS: acción de flipasas y escramblasas

La distribución asimétrica de PS en membrana es producto de la acción concertada de dos tipos de enzimas: las flipasas y las escramblasas.

Las flipasas, también llamadas proteínas translocasas de aminofosfolípidos, movilizan activamente PS y fosfatidiletanolamina desde la superficie extracelular de la membrana plasmática o, equivalentemente, desde el lado luminal de una organela, hacia el lado citosólico de la bicapa (Pomorski y Menon, 2006). La función principal de estas

enzimas es generar y mantener la distribución asimétrica de dichos fosfolípidos a lo largo de la bicapa lipídica (Pomorski et al., 2004). Se ha reportado que la actividad flipasa es dependiente de ATP y Mg^{2+} , transportando una molécula de PS por ATP hidrolizado con mayor afinidad y velocidad que para fosfatidiletanolamina. Además estas enzimas son inhibidas reversiblemente por un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ ($>0,2 \mu M$). Si bien la actividad flipasa ha sido detectada en forma ubicua en la mayoría de las membranas de distintos tipos celulares, la identificación de las enzimas responsables ha sido dificultosa. Esta actividad estaría mediada por un grupo de enzimas de 10 pasos transmembrana que pertenecen a la familia de ATPasas tipo P4. El miembro fundador de esta familia es el gen *Drs2* de levaduras, cuyo homólogo en mamíferos es *Atp8a1* (Lenoir et al., 2007). Actualmente, se conocen por lo menos 14 genes homólogos en humanos (Yang et al., 2018).

Por otro lado, las escramblasas son enzimas que movilizan fosfolípidos en ambas direcciones, generando una disrupción en la asimetría de los fosfolípidos en las membranas (Leventis y Grinstein, 2010). Esta translocación, que ocurre sin gasto de energía y depende del aumento de $[Ca^{2+}]_i$, resulta en la exposición de PS en la cara externa de la bicapa. La actividad escramblasa ha sido atribuida exclusivamente a un grupo de proteínas muy conservadas en todos los eucariotas, constituyendo, tanto en humano como en ratón, una familia génica con cuatro miembros homólogos (PLSCR1-4), con diferente regulación y expresión tejido específica (Sahu et al., 2007). No obstante, en los últimos años se ha descrito que otras proteínas, como Xkr8 y el canal TMEM16F, jugarían roles fundamentales en la translocación de PS durante la apoptosis y la activación de plaquetas, respectivamente (Suzuki et al., 2010a, 2013).

Funciones biológicas de PS

Clásicamente la exposición de PS en la cara extracelular ha estado asociada al reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas (Fadok et al., 1992). Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado evidencia que apoya la idea de un rol funcional de esta exposición en diferentes procesos celulares así como también en la modulación de ciertas vías de transducción de señales. A continuación, se resumen algunos de los procesos en los que se ha descrito la externalización de PS.

Apoptosis

Al desencadenarse el proceso de apoptosis, ocurre en la célula la activación de una cascada de proteasas específicas denominadas caspasas, la liberación del citocromo C desde la mitocondria y otra serie de eventos bioquímicos y celulares (Nuñez et al., 1998). En consecuencia, la célula apoptótica experimenta fragmentación del ADN mediada por endonucleasas y un cambio en la estructura del citoesqueleto que conduce a la formación de pliegues en la membrana plasmática y a la fragmentación del citoplasma (Elmore, 2007). Una de las consecuencias de estos fenómenos es la rápida exposición de PS en la superficie de las células, dada por una elevación de $[Ca^{2+}]_i$, que resulta una señal necesaria para su reconocimiento y remoción por células fagocíticas (Fadok et al., 1992). Es por esto que, desde hace ya varios años, la exposición de PS es un fenómeno utilizado como señal temprana de apoptosis (Balasubramanian et al., 2007). Si bien el mecanismo que media la translocación de PS en células apoptóticas era desconocido, en los últimos años se ha descrito que ocurre como consecuencia de la acción de las caspasas que clivan tanto a Xkr8 como a ATP11C produciendo la activación de la actividad escramblasa (Suzuki et al., 2013) y la inactivación de la flipasa (Segawa et al., 2016), respectivamente.

Evasión del sistema inmune en parásitos intracelulares

Varios trabajos han demostrado que la exposición de PS es utilizada por algunos parásitos protozoarios intracelulares obligados como un mecanismo de evasión del sistema inmune del huésped (de Freitas Balanco et al., 2001; Seabra et al., 2004; Wanderley et al., 2006; Damatta et al., 2007). La exposición de PS en la superficie del parásito induce en los macrófagos infectados la expresión y secreción de TGF- β (Factor de crecimiento transformante β) simulando una respuesta anti-inflamatoria. La activación de esta vía conduce a la inactivación del macrófago y a la consecuente supervivencia y multiplicación del parásito (Seabra et al., 2004).

Fusión de membranas

Se ha visto que, en algunos casos, la exposición de PS es un fenómeno necesario para la fusión de membranas. Por ejemplo, es requerida para la fusión de mioblastos

durante el desarrollo del músculo (Sessions y Horwitz, 1981, 1983). De modo similar, la fusión entre células citotrofoblásticas, que forman largos sincicios durante el crecimiento de la placenta, requiere una previa externalización de PS, por lo que éste es un evento esencial durante el crecimiento y diferenciación de la placenta (Das et al., 2004). Por otro lado, también se ha visto que algunos virus con envoltura requieren una exposición de PS en su membrana para poder fusionarse con la célula huésped (Mercer y Helenius, 2008). El mecanismo de entrada del virus involucraría un proceso de macropinocitosis que estaría mediado por un receptor específico de PS.

Activación de plaquetas

Numerosos hallazgos en distintos tipos celulares han demostrado que la exposición de PS es un evento que también ocurre en fenómenos de activación celular (Bever et al., 1999; Kunzelmann-Marche et al., 2001; Kato et al., 2002; Fischer et al., 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición de PS en plaquetas es la señal que dispara la unión y activación de factores de coagulación (factores V, VIII, X y protrombina) (Solum, 1999). En este sentido, pacientes con Síndrome de Scott, un trastorno hemorrágico con desórdenes en la coagulación, han presentado menor exposición de PS en sus plaquetas, la cual sería consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para TMEM16F (Suzuki et al., 2010a).

Capacitación espermática

Se ha reportado que PS se expone en la membrana plasmática de espermatozoides porcinos y humanos durante la capacitación (Gadella y Harrison, 2000; De Vries et al., 2003). Esta exposición sería dependiente de la cascada de fosforilación de proteínas desencadenada por AMP cíclico y estaría mediada por escramblasas de la familia PLSCR (De Vries et al., 2003). Si bien no se elucidó su relevancia funcional, la exposición de PS en espermatozoides no presentó relación con la activación de la cascada de caspasas o con el daño mitocondrial o del ADN (Gadella y Harrison, 2002), indicando que no estaría asociada a la apoptosis espermática.

Endocitosis compensatoria (EC)

Tanto en células neuroendócrinas cromafines como en neuronas la exposición de PS ocurre luego de la exocitosis de neurotransmisores dependiente de calcio (Lee et al., 2000; Ory et al., 2013). Esta externalización fue detectada en los sitios de fusión de los gránulos exocíticos y asociada a un mecanismo homeostático de recaptura de su membrana a través de una EC (Ory et al., 2013). Para ello, los autores alteraron la función de PLSCR1 endógena en células cromafines a través de la expresión de una mutante dominante negativa de esta escramblasa, insensible al calcio (Zhao et al., 1998). Si bien estas células liberaban sus neurotransmisores con normalidad frente a un estímulo exocítico, no translocaban PS en su membrana y tenían afectada la capacidad de recapturar su membrana por EC (Ory et al., 2013), indicando una asociación funcional entre la movilización de PS y la EC.

Fertilización

Nuestro laboratorio reportó por primera vez que en la membrana plasmática del ovocito de ratón ocurre la translocación de PS luego de la entrada del espermatozoide fertilizante (Curia, 2011). Mediante el uso de una forma fluoresceinada de anexina-5 (ANX5-FITC), proteína que se une con gran afinidad a la PS expuesta (Van Genderen et al., 2008), se observó que poco después de la fusión de gametas ocurría en el oolema de ovocitos sin ZP la exposición de este fosfolípido en forma de parches, con excepción de la región que recubría el huso meiótico (Fig. 1.2). En contraposición, tanto los ovocitos inseminados que no resultaron fertilizados así como los no expuestos a espermatozoides no presentaban marcación en su membrana (Fig. 1.2).

La translocación de PS fue detectada también ovocitos fertilizados con ZP, indicando que la movilización del fosfolípido no era una consecuencia de la remoción química de esta envoltura. Por otro lado, 3 horas después de la inseminación, y en forma concomitante con la descondensación de la cabeza espermática, se evidenció la pérdida de la marca fluorescente en el sitio de entrada del espermatozoide. Más aún, en ovocitos polispérmicos la ausencia de marca se manifestó en las regiones que recubrían cada uno de los espermatozoides fertilizantes. Cuando el fenómeno de translocación fue evaluado varias

horas después de la inseminación, se observó que el área del ovocito exponiendo PS disminuía, siendo menor a las 6 horas (estadio de pronúcleos), y completamente indetectable a las 24 horas en estadio de 2 células, lo que indicaba que la exposición de PS inducida por el espermatozoide es transitoria. Por otra parte, en el ovocito murino se detectó la presencia de los transcriptos correspondientes a las flipasas *Atp8a1* y *Atp8a2* y a la escramblasa *Plscr1*, pudiendo ser éstas las enzimas responsables de la movilización de PS en esta célula. Si bien también se evidenció expresión de *Plscr3*, esta escramblasa se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial (Merrick et al., 2011) por lo que no contribuiría al fenómeno aquí descripto.

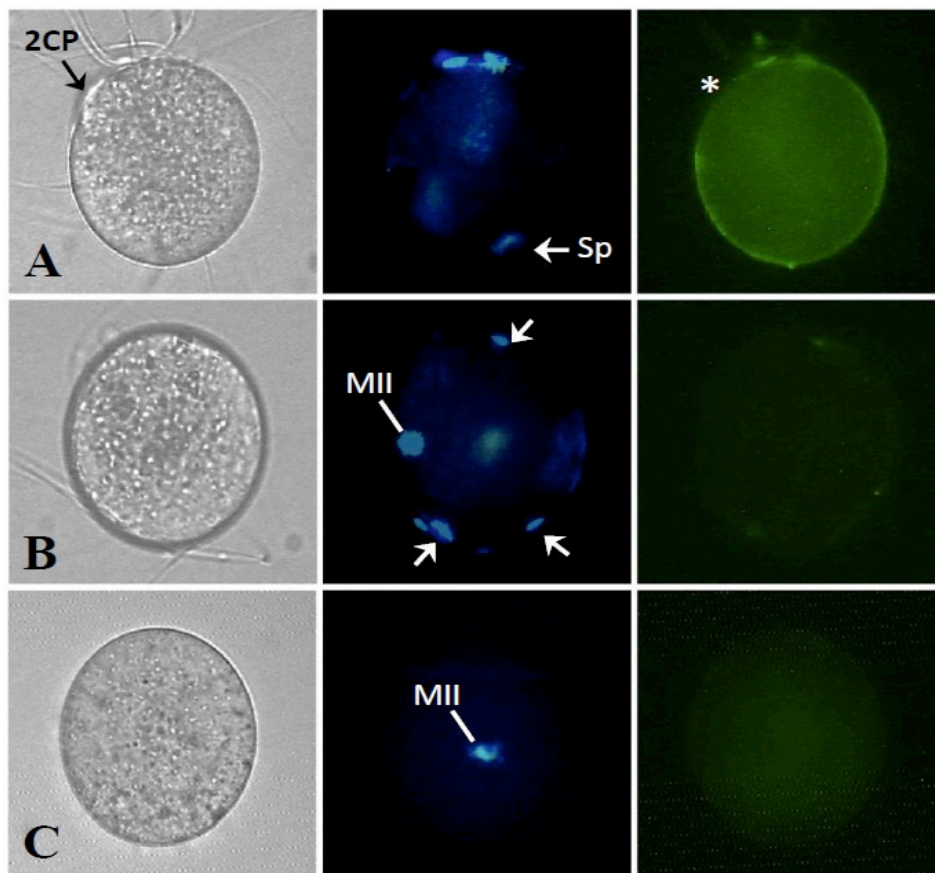


Figura 1.2. Detección de PS externalizada en ovocitos de ratón sin ZP. Tinción con ANX5-FITC de ovocitos sin ZP fertilizados (A), no fertilizados (B) y no inseminados (C). Las flechas blancas indican la cabeza descondensada del espermatozoide fertilizante (Sp) en (A) y los espermatozoides unidos no fusionados en (B). En (A) hay reasunción de meiosis con extrusión de segundo corpúsculo polar (*2CP), mientras que en (B) y (C) los ovocitos se encuentran arrestados en metafase II (MII). Nótese que solamente en el ovocito fertilizado (A) se evidencia la marca de ANX5-FITC con excepción de la zona donde se extruyó el 2CP (Curia, 2011).

HIPÓTESIS

Dado el rol fundamental que cumple la translocación de PS en otros sistemas celulares y que no ha sido dilucidado cómo la movilización de PS impacta mecánicamente y funcionalmente sobre el ovocito fertilizado, nuestra hipótesis es que la movilización de PS es un efector molecular implicado en eventos de señalización en el ovocito luego de la entrada del espermatozoide, requerido para la correcta activación ovocitaria.

OBJETIVO ESPECÍFICO

En función de la hipótesis planteada y considerando los antecedentes mencionados, el objetivo específico de este capítulo consistió en el estudio de los mecanismos involucrados en la movilización de PS que ocurre en el ovocito luego de la fertilización y su relevancia para la activación ovocitaria.

RESULTADOS

Tal como se mencionó en la Introducción, la exposición de PS ha sido descrita en ovocitos de ratón fertilizados *in vitro* (Curia, 2011). Para continuar la caracterización de este fenómeno, nos propusimos en primer lugar corroborar que el mismo ocurriera *in vivo*. Para ello, hembras superovuladas fueron puestas en apareo por un período corto (40 minutos), alrededor del horario en que ocurriría la ovulación, y siete horas después se analizaron los ovocitos colectados del oviducto. Con este esquema experimental fue posible recuperar ovocitos fertilizados antes de ocurrir la singamia, pudiendo así evaluar estadios tempranos de la activación. Los ovocitos obtenidos se incubaron con ANX5-FITC para detectar la PS expuesta y con Hoechst 33342 para teñir el ADN e identificar a aquellos que estaban fertilizados por presencia de al menos una cabeza espermática descondensada en el ooplasma. Observamos que, mientras los ovocitos no fertilizados no presentaban marcación con ANX5-FITC, aquellos que sí lo estaban presentaban marca positiva para esta sonda en el oolema (Fig. 1.3). Esta marcación fue detectada en toda la membrana, con excepción de las regiones recubriendo tanto el ADN materno como la cabeza espermática descondensada (Fig. 1.3). Estos resultados indicaron que la translocación de PS originalmente descrita *in vitro* también ocurría en ovocitos fertilizados *in vivo*.

Sabiendo que la entrada del espermatozoide fertilizante tanto *in vitro* como *in vivo* gatilla en el ovocito la exposición de PS en su membrana, decidimos a continuación estudiar si esta translocación era consecuencia directa de la fusión de las gametas o de las vías de señalización que ocurren durante la activación ovocitaria. Para ello, evaluamos en primer lugar la ocurrencia de la movilización de PS en ovocitos activados partenogenéticamente por incubación con SrCl_2 10 mM. En paralelo, se emplearon ovocitos MII no activados como control negativo. Mientras que estos últimos no presentaron marca de ANX5-FITC en membrana, la mayoría de los ovocitos activados presentaban marca fluorescente similar a la de los fertilizados (Fig 1.4), indicando que la exposición estaría inducida por la activación y sería independiente de la entrada del espermatozoide. Al igual que en los ovocitos fertilizados, la marca se encontraba en forma de parches sobre el oolema y ausente sobre la zona recubriendo el huso meiótico. Por otra parte, si bien estos ensayos inicialmente fueron realizados con 1 hora de incubación con SrCl_2 , se obtuvieron resultados similares

con tiempos de incubación tan cortos como 15 minutos, sugiriendo que la exposición de PS es un evento temprano en la activación.

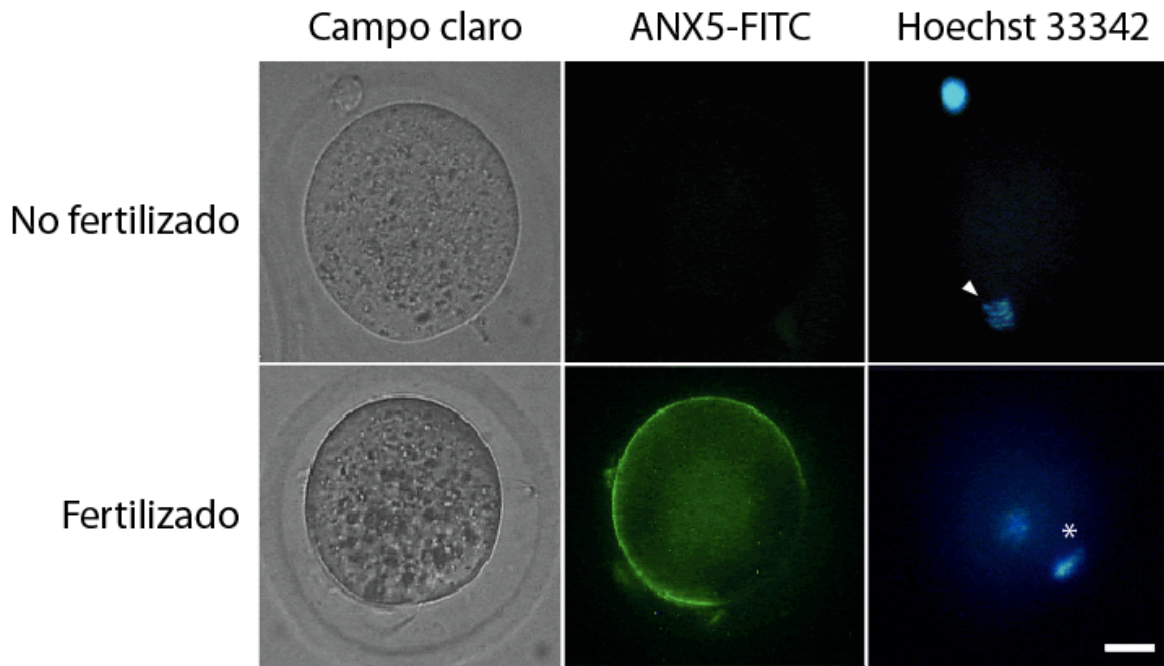


Figura 1.3 Exposición de PS en ovocitos fertilizados *in vivo*. Hembras superovuladas fueron puestas en apareo con machos de fertilidad probada por 40 minutos. Siete horas luego de confirmado el apareo, se recuperaron los ovocitos de los oviductos y se incubaron con ANX5-FITC y Hoechst 33342. Los ovocitos no fertilizados estaban arrestados en MII (punta de flecha), mientras que los fertilizados contenían cabezas descondensadas en su citoplasma (asterico). Notar que el ovocito fertilizado presenta marca positiva para ANX5-FITC en la membrana con la excepción del sitio de entrada del espermatozoide. El segundo corpúsculo polar en este caso se encuentra en otro plano focal. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia y son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Barra: 20 μ m.

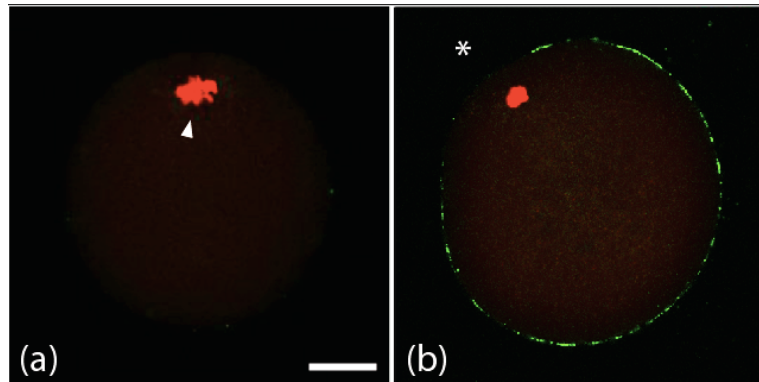


Figura 1.4 Exposición de PS en ovocitos activados partenogenéticamente con Sr^{2+} . Ovocitos maduros de ratón sin ZP fueron incubados en ausencia (a) o presencia de SrCl_2 10 mM (b) por 1 hora. Luego se incubaron una hora adicional con ANX5-FITC (verde), se fijaron y el ADN se tiñó con TO-PRO 3 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. La punta de flecha en el panel (a) señala la metafase mientras que el asterisco en el panel (b) indica la posición del segundo corpúsculo polar, cuyo ADN se encuentra en otro plano focal. Notar la marca positiva para ANX5-FITC en la membrana del ovocito activado con Sr^{2+} , con excepción de la zona que recubre el ADN materno. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μm .

Dado el rol central que cumple el calcio intracelular en la regulación espacio-temporal de los distintos eventos de la activación ovocitaria (Sanders y Swann, 2016), se evaluó si la exposición de PS era consecuencia del aumento citoplasmático de este catión. Para ello, se preincubaron los ovocitos con el quelante de calcio intracelular BAPTA-AM y luego se los trató con SrCl_2 . En esta condición, no se evidenció la reasunción de la meiosis ni la exposición de PS (Fig 1.5.a). Para discernir entonces si la translocación de PS era consecuencia del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o de la salida del arresto meiótico, se llevaron a cabo las dos estrategias experimentales que se describen a continuación. En la primera, se emplearon ovocitos provenientes de hembras carentes de CAMKII γ (CAMKII $\gamma^{-/-}$), que exhiben oscilaciones de Ca^{2+} normales pero no reasumen la meiosis luego de la fertilización (Bacs et al., 2010). Luego de su activación con Sr^{2+} e incubación con ANX5-FITC, se observó que, aun cuando los ovocitos presentaban arresto en MII, la marca fluorescente en la membrana era similar a la observada en ovocitos salvajes (Fig 1.5.b). En el segundo abordaje, la exposición de PS se evaluó en ovocitos salvajes activados con TPEN, un quelante de Zn^{2+} que induce la salida de MII sin causar cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Suzuki et al., 2010b). En este caso, la mayoría de los ovocitos salieron del arresto meiótico pero no presentaron marca fluorescente para ANX5-FITC (Fig 1.5.c). En conjunto, estos resultados

sugieren que la exposición de PS en los ovocitos de ratón requiere del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y no de la reasunción de la meiosis.

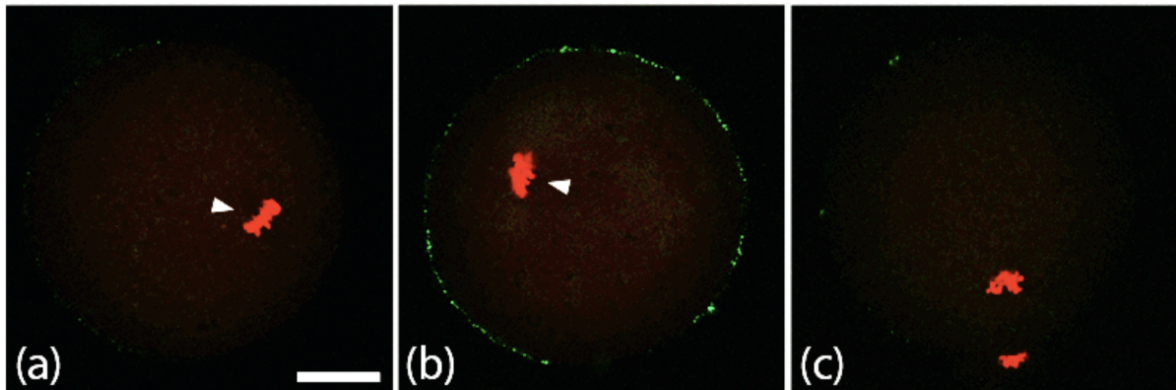


Figura 1.5 Estudio de la participación del calcio intracelular en la exposición de PS. (a) Ovocitos sin ZP fueron preincubados con BAPTA-AM 50 μ M y luego activados por 1 hora con $SrCl_2$ 10 mM. (b) Ovocitos sin ZP provenientes de hembras *CAMKIIy*^{-/-} se activaron por 1 hora con $SrCl_2$ 10 mM. (c) Ovocitos salvajes sin ZP se activaron por 1 hora con TPEN 100 μ M. En todos los casos, los ovocitos fueron tratados una hora adicional con ANX5-FITC (verde), se fijaron y el ADN se tiñó con TO-PRO 3 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. La punta de flecha en los paneles (a) y (b) señala la metafase del ovocito. Notar la reasunción de la meiosis en el panel (c). La marcación positiva para ANX5-FITC en la membrana se observa únicamente en el panel (b). Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μ m.

Además de la activación partenogenética con Sr^{2+} , los ovocitos de ratón pueden ser activados con otros compuestos químicos, entre los que se encuentran el etanol en un medio conteniendo calcio (Shiina et al., 1993) y el ionóforo de calcio A23187 en un medio carente de calcio extracelular (Vincent et al., 1992). En contraposición al Sr^{2+} que genera oscilaciones de Ca^{2+} similares a las inducidas por el espermatozoide fertilizante (Kline y Kline, 1992a), los tratamientos con etanol o con A23187 producen un único pico de calcio (Vincent et al., 1992; Shiina et al., 1993). Sin embargo, mientras que el etanol permite la entrada de calcio del medio de cultivo, el ionóforo en ausencia de calcio extracelular solamente permite la salida de este catión de los reservorios intracelulares. Considerando las diferencias entre ambos agentes activadores, y con el fin de profundizar en el estudio del rol del Ca^{2+} en la exposición de PS, los ovocitos fueron activados con etanol 7% ó A23187 5 μ M y expuestos a ANX5-FITC. En todos los casos, las tasas de activación, con reasunción de la meiosis y extrusión del segundo corpúsculo polar, fueron superiores al 70%. Se pudo observar que, mientras que los ovocitos activados con etanol presentaron marca positiva para ANX5-FITC en su membrana, de manera similar a lo obtenido con el tratamiento con

SrCl₂, los activados con A23187 no lo hicieron (Fig 1.6). Los resultados con A23187 fueron similares empleando distintas concentraciones de ionóforo (5-10 μ M).

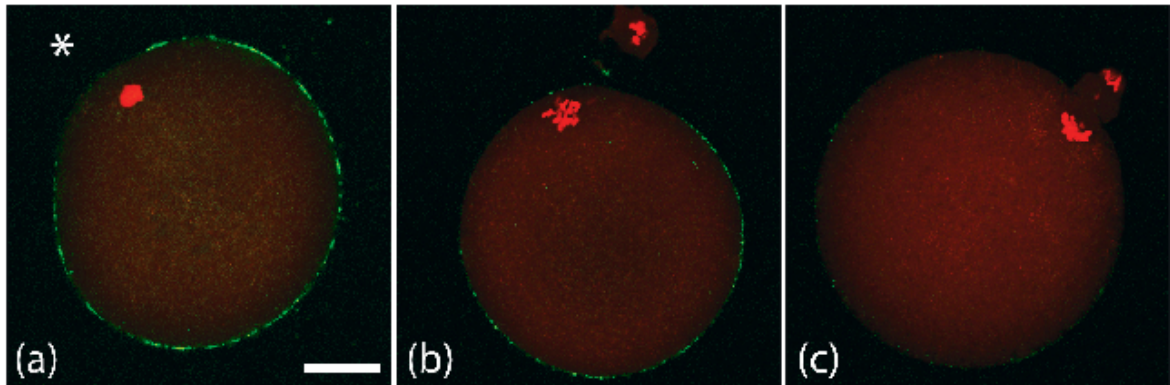


Figura 1.6 Exposición de PS en ovocitos incubados con diferentes agentes activadores. Ovocitos maduros de ratón sin ZP fueron activados con SrCl₂ 10 mM (a), etanol 7% (b) o ionóforo de calcio A23187 5 μ M (c). Luego se incubaron una hora adicional con ANX5-FITC (verde), se fijaron y el ADN se tiñó con TO-PRO 3 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. El asterisco en el panel (a) indica la posición del segundo corpúsculo polar, cuyo ADN se encuentra en otro plano focal. Notar la reasunción de la meiosis en los tres casos y la marcación positiva para ANX5-FITC únicamente en los paneles (a) y (b). Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μ m.

Tal como se mencionó previamente, la activación con A23187 en un medio sin calcio extracelular genera un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ producto de su salida de los reservorios del ovocito (principalmente del retículo endoplasmático). El hecho de que en estas condiciones no se observara exposición de PS podría ser consecuencia de que este fenómeno requiriera la entrada de Ca^{2+} extracelular. Para evaluar esta posibilidad, nos propusimos activar los ovocitos con el ionóforo de calcio en presencia de Ca^{2+} en el medio de cultivo (1.7 mM) de forma de favorecer su influjo a las células. Sin embargo, la presencia de calcio extracelular durante la activación con A23187 5 μ M durante 5 minutos produjo altas tasas de muerte celular, probablemente debido a una entrada masiva y un aumento exacerbado de este catión. Luego de la evaluación de distintas condiciones experimentales, encontramos que 1 minuto de incubación en presencia de A23187 5 μ M en medio completo, seguido de exhaustivos lavados en un medio sin calcio, resultó en la salida del arresto meiótico y la extrusión del segundo corpúsculo polar, sin provocar la muerte celular. Más aún, en esta condición el ionóforo indujo la exposición de PS (Fig 1.7), reforzando la importancia de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular para la ocurrencia de este fenómeno.

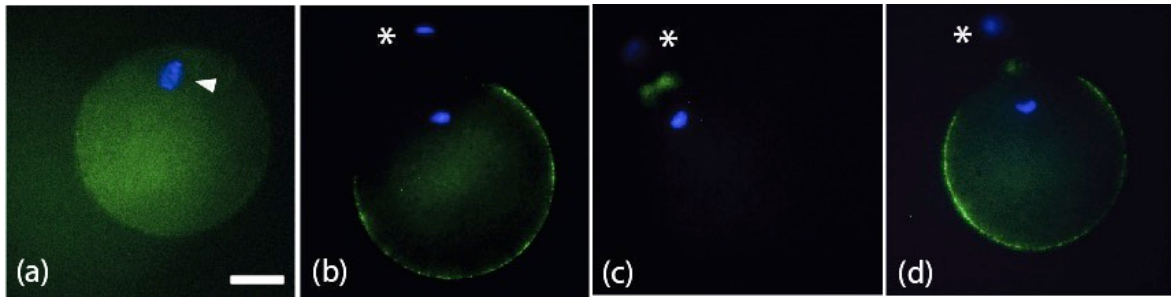


Figura 1.7 Exposición de PS en ovocitos activados con A23187 en presencia de calcio extracelular. Ovocitos maduros de ratón sin ZP (MII, a), activados con Sr^{2+} (b) o activados con A23187 5 μ M sin calcio extracelular por 5 minutos (c) o con Ca^{2+} 1.7 mM por 1 minuto (d) fueron incubados por 1 hora con ANX5-FITC (verde), se fijaron y el ADN se tiñó con Hoechst 33342 (azul). Las imágenes fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia. La punta de flecha indica la metafase en el panel (a), mientras que los asteriscos indican la posición del segundo corpúsculo polar en los paneles (b), (c) y (d), en los cuales hay reasunción de la meiosis. Notar la marcación positiva para ANX5-FITC únicamente en los paneles (b) y (d). Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μ m.

Luego de la activación, y como parte de la exocitosis cortical, ocurren múltiples eventos de fusión entre los GC y el oolema. Dado que la movilización de fosfolípidos podría ser una consecuencia de estos cambios en la membrana del ovocito, se estudió si la traslocación de PS podía estar asociada con la exocitosis de GC. Para ello, la exocitosis cortical fue evaluada por tinción con una forma rodaminada de la lectina *Lens culinaris* agglutinin (LCA-TRITC), ampliamente utilizada para marcar el contenido de los GC (Ducibella et al., 1988). La incubación con LCA-TRITC nos permitió visualizar los GC intactos en ovocitos permeabilizados y el exudado cortical en no permeabilizados. Tal como se reportó previamente, los ovocitos MII permeabilizados presentaban una marcación intensa para LCA-TRITC, a diferencia de los no permeabilizados (Fig. 1.8), indicando que el contenido de GC se encontraba intacto. Por otro lado, tanto los activados con Sr^{2+} como con A23187 (sin calcio extracelular) exhibían una menor tinción de LCA-TRITC en ovocitos permeabilizados e intensa marcación en el oolema de ovocitos no permeabilizados (Fig. 1.8), indicando la ocurrencia de la exocitosis cortical. Por lo tanto, aun cuando la activación con A23187 no induciría la exposición de PS, era capaz de conducir a la exocitosis de GC, sugiriendo que ambos eventos de membrana ocurrirían en forma independiente.

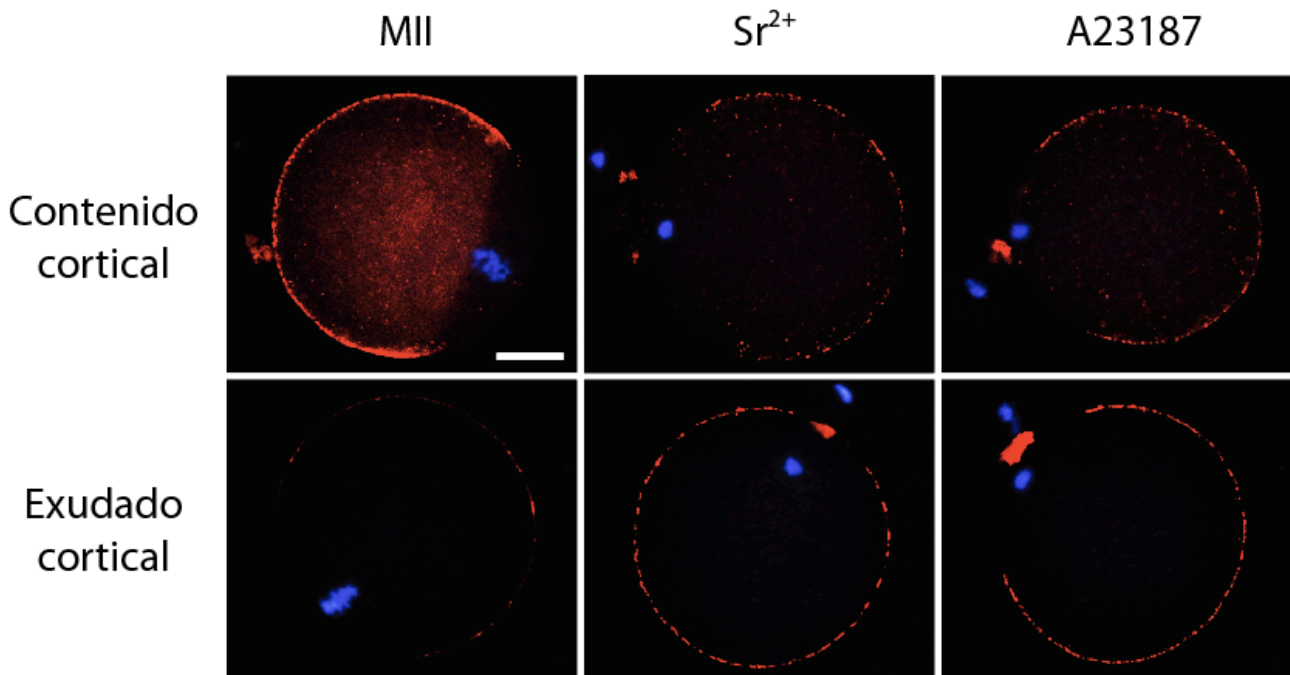


Figura 1.8 Exocitosis de GC en ovocitos incubados con diferentes agentes activadores. Ovocitos maduros de ratón sin ZP (MII), activados con Sr^{2+} 10 mM o activados con A23187 5 μM fueron teñidos con LCA-TRITC (rojo), tal como se indica a continuación, para la evaluación del contenido (panel superior) o exudado (panel inferior) cortical. En el primer caso, los ovocitos se fijaron, permeabilizaron e incubaron con la lectina fluorescente, mientras que en el segundo, los ovocitos vivos se incubaron con la lectina y luego se fijaron. En todos los casos, el ADN se marcó con Hoechst 33342 (azul). Notar que, a diferencia de los ovocitos MII, los tratados con Sr^{2+} y A23187 exhiben reasunción de la meiosis, disminución del contenido cortical y presencia de exudado cortical. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μm .

La evaluación simultánea de la externalización de PS y la exocitosis cortical en el mismo ovocito, sin embargo, no resultaba posible con las sondas utilizadas (ANX5-FITC y LCA-TRITC), debido a que sus espectros de emisión de fluorescencia eran cercanos. De esta manera, no se podía discriminar si ambos eventos eran realmente independientes. Por lo tanto, para poder lograr la doble marcación, recurrimos al uso de otra forma fluorescente de LCA (LCA-DyLight 649), cuya longitud de onda de emisión se encuentra más alejada de la de FITC, evitando interferencias con la sonda para detectar PS expuesta. Para realizar la evaluación simultánea, ovocitos MII o activados con Sr^{2+} o A23187 se co-incubaron con ANX5-FITC y LCA-DyLight 649 y se examinaron por microscopía confocal. Consistente con nuestras observaciones en los ensayos de simple marcación, las membranas de los ovocitos activados con A23187 presentaban marca para LCA, pero no para ANX5-FITC (Fig 1.9), corroborando la disociación de la exocitosis cortical y la exposición de PS en el mismo

ovocito. Por otra parte, los ovocitos activados con Sr^{2+} exhibían marcación para ambas sondas, con un patrón de distribución similar en el oolema (Fig 1.9).

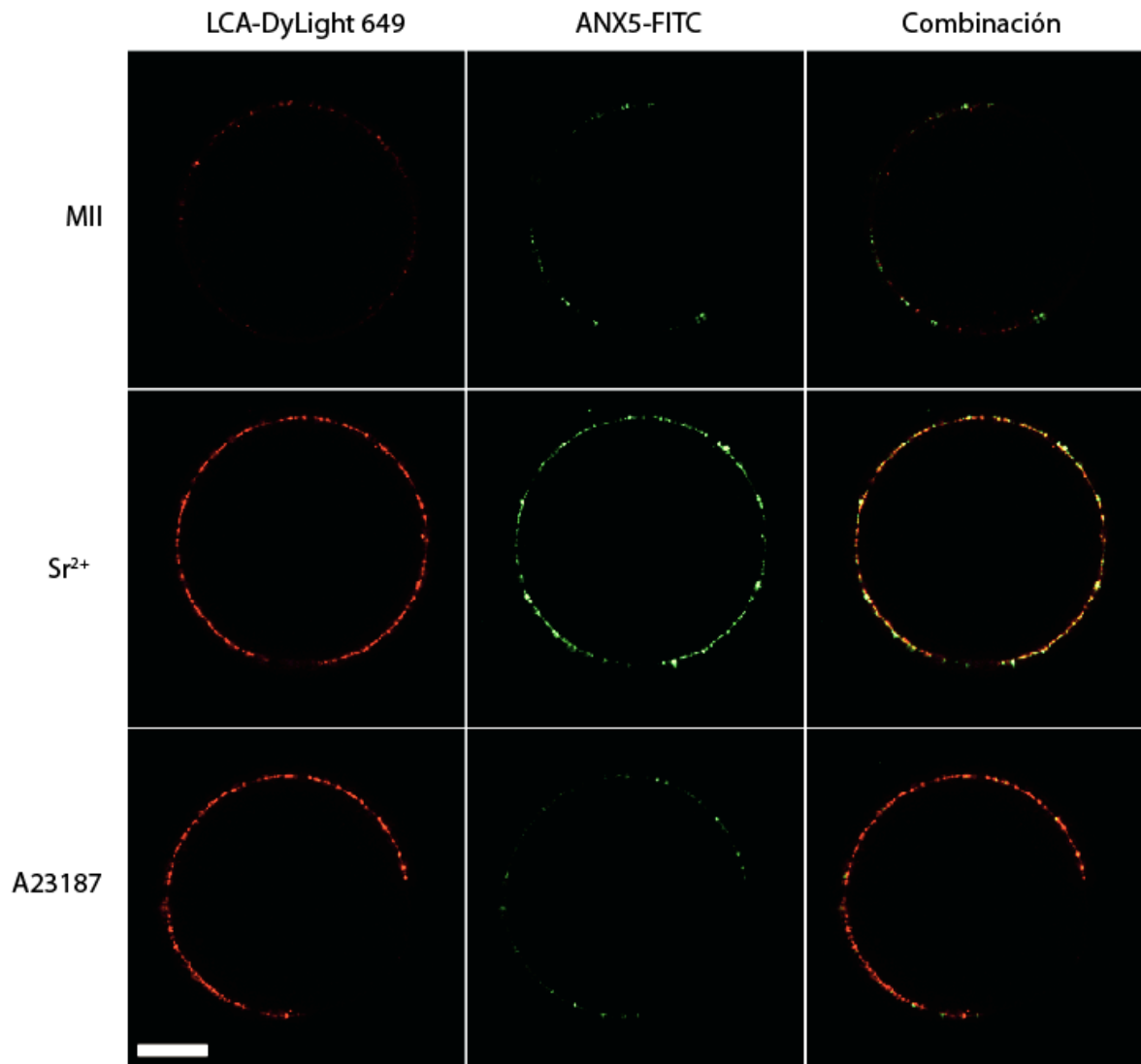


Figura 1.9 Evaluación simultánea de la exocitosis de GC y la exposición de PS en ovocitos activados. Ovocitos maduros de ratón sin ZP (MII), activados con Sr^{2+} 10 mM o activados con A23187 10 μM sin calcio extracelular fueron tratados con ANX5-FITC por 1 hora adicional y con LCA-DyLight 649 los últimos 15 minutos. Posteriormente se fijaron y se analizaron por microscopía confocal. Notar que solamente el tratamiento con Sr^{2+} produjo exposición de PS, cuya distribución es similar a la marca del exudado cortical. Los ovocitos activados con A23187, a pesar de exhibir presencia de exudado cortical, no tienen marca positiva para ANX5-FITC. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μm .

Asimismo, a partir de la adquisición de múltiples planos focales de los ovocitos activados con Sr^{2+} y la subsiguiente reconstrucción tridimensional de los mismos, pudimos observar que la exposición de PS ocurría mayoritariamente en los sitios donde se habrían fusionado los GC con la membrana plasmática (Fig 1.10). En este sentido, un análisis

posterior en el que se evaluó la co-localización de ANX5-FITC y LCA-DyLight 649 en al menos dos planos focales de cada ovocito indicó que, en aquellos activados con Sr^{2+} , ambas sondas co-localizaban en un 73.6% (47 ovocitos analizados). Entonces, si bien el uso del ionóforo A23187 permitió disociar la translocación de PS del evento exocítico, el ensayo de co-localización en ovocitos activados con Sr^{2+} abrió la posibilidad de que PS cumpliera un rol funcional posterior a la exocitosis, producto de su exposición en los sitios de fusión de los GC.

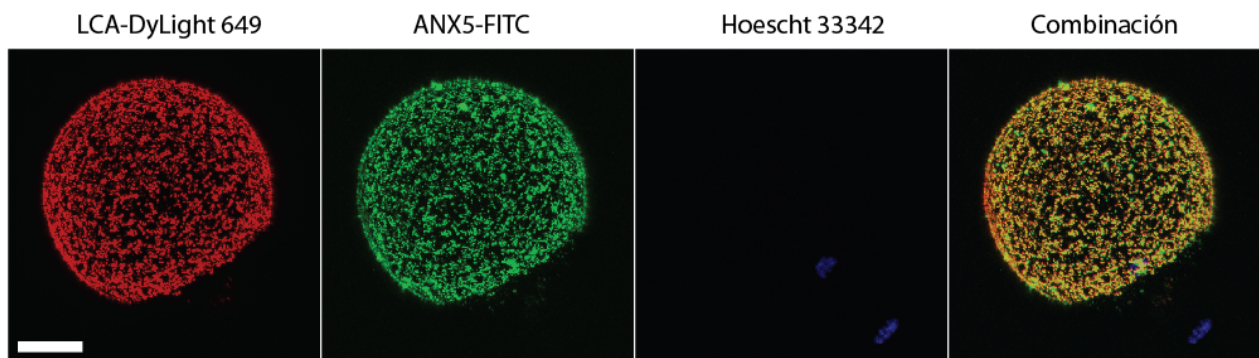


Figura 1.10 Reconstrucción 3D de un ovocito activado con Sr^{2+} e incubado con LCA y ANX5-FITC. Ovocitos MII fueron activados con SrCl_2 10 mM durante 1 hora, tratados con ANX5-FITC por 1 hora adicional y con LCA-DyLight 649 los últimos 15 minutos. Posteriormente se fijaron, el ADN se tiñó con Hoechst 33342 y se observaron por microscopía confocal. Se obtuvieron imágenes de distintos planos de los ovocitos cada 1 μm . Notar que la zona donde ocurre la extrusión de segundo corpúsculo polar es libre de marca para ambas sondas. Barra: 20 μm .

A continuación, ahondando en el estudio de la participación del calcio en la exposición de PS, se evaluaron otras drogas que inducen el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ovocitos murinos por distintos mecanismos. En particular, los ovocitos fueron tratados con 2-APB (2-aminoetoxidifenilborato) 200 μM , un agonista del canal de calcio TRPV3 que induce la entrada de calcio extracelular (Carvacho et al., 2013; Lee et al., 2016), o timerosal 50 μM , un compuesto organomercúrico que produce oscilaciones de calcio por liberación de este ion del retículo endoplasmático (Swann, 1992; Cheek et al., 1993). A pesar de que ambos tratamientos indujeron la activación del ovocito, evidenciada por la presencia de exudado cortical, únicamente aquellos tratados con 2-APB expusieron PS (Fig 1.11). Cabe aclarar que, a diferencia del tratamiento con SrCl_2 y 2-APB, en presencia de timerosal no se observó la reasunción de la meiosis ya que esta droga desorganiza el huso meiótico del ovocito (Cheek et al., 1993). Sin embargo, la disrupción en la salida de la meiosis con timerosal no estaría asociada a la ausencia de translocación del fosfolípido dado que, tal como se mostró

previamente, el desarresto meiótico y la exposición de PS serían eventos desacoplados (ver Fig. 1.5).

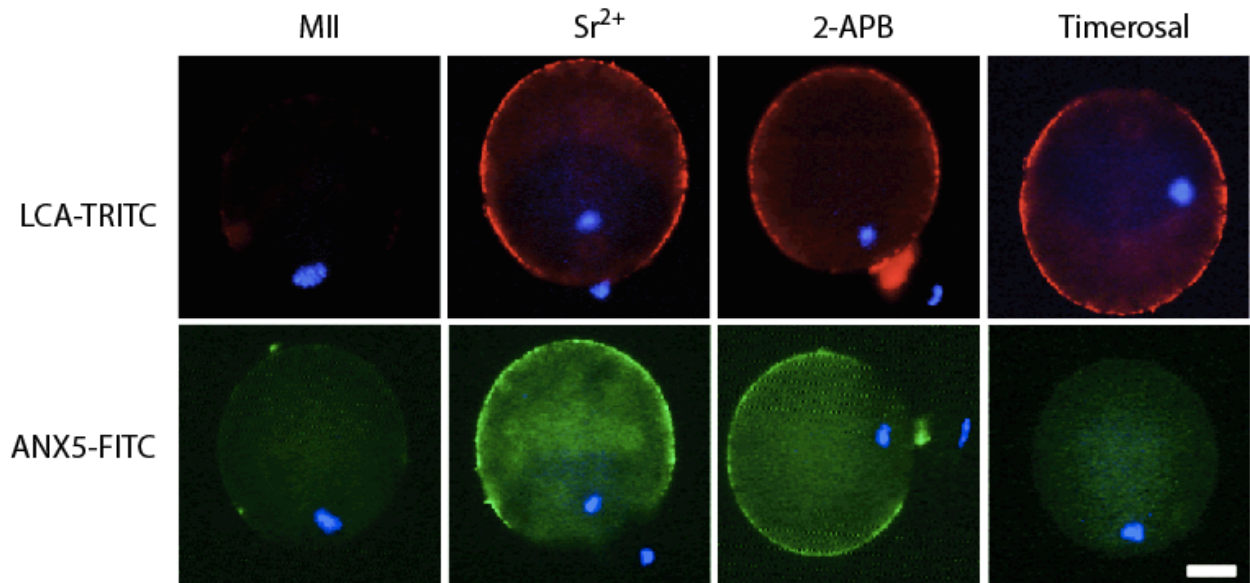


Figura 1.11 Exocitosis de GC y exposición de PS en ovocitos activados con 2-APB y timerosal.

Ovocitos maduros de ratón sin ZP se incubaron en medio completo (MII), o se activaron con SrCl_2 10 mM, 2-APB 200 μM o timerosal 50 μM . Los ovocitos fueron incubados con LCA-TRITC (rojo) para detectar el exudado cortical o con ANX5-FITC (verde) para evaluar la PS expuesta. Luego se fijaron y el ADN se tiñó con Hoechst 33342 (azul). Distinguir la extrusión del segundo corpúsculo polar en los tratamientos con Sr^{2+} y 2-APB, que no se detecta con timerosal ya que causa la desorganización del huso meiótico (Cheek et al., 1993). Notar que si bien la marcación del exudado cortical con LCA-TRITC se observa en presencia de los agentes activadores, no se observa marca de ANX5-FITC en la membrana tras la activación con timerosal. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μm .

Dado que durante la fertilización y la activación ocurren en el ovocito complejas modificaciones en el citoesqueleto de actina (Maro et al., 1990; Sun y Schatten, 2006), se evaluó el rol de estas estructuras en la exposición de PS. Para ello, ovocitos tratados con Citocalasina D (CytD) o Jasplakinolide (Jas) se activaron con Sr^{2+} y se evaluó la presencia de PS expuesta. Estos dos reactivos juegan roles antagónicos sobre el citoesqueleto de actina: mientras que CytD inhibe la adición de actina monomérica globular (G-actina) a los microfilamentos y reduce la polimerización (Cooper, 1987), Jas induce la polimerización de actina y estabiliza los microfilamentos existentes (Bubb et al., 1994). En todos los casos, la efectividad del tratamiento se monitoreó evaluando la extrusión del segundo corpúsculo polar y detectando los microfilamentos de actina por tinción con faloidina acoplada a FITC. Además, se evaluó la exocitosis cortical por tinción del exudado con LCA-TRITC. En primer

lugar, observamos que el tratamiento de ovocitos MII con estos inhibidores no indujo la salida del arresto meiótico, la exocitosis cortical o la exposición de PS. Por otro lado, los ovocitos activados en presencia de CytD, a pesar de presentar una exocitosis de GC similar al control, exhibieron una distribución anormal de F-actina y fallaron en la rotación del huso meiótico y en la emisión del segundo corpúsculo polar (Fig. 1.12). Asimismo, aquellos activados en presencia de Jas no emitieron el segundo corpúsculo polar ni sufrieron la reacción cortical (Fig. 1.12). En este caso, los filamentos no pudieron ser detectados debido a que Jas compite con la unión de faloidina a F-actina impidiendo su marcación. En cuanto a la evaluación de la exposición de PS tras ambos tratamientos, se observó que, mientras que los ovocitos tratados con CytD presentaban una marca de ANX5-FITC similar a los controles, los activados con Jas carecían de marca positiva, sugiriendo que la exposición de PS requeriría la despolimerización de los microfilamentos de actina.

Una vez caracterizado el rol del calcio y del citoesqueleto de actina sobre la exposición de PS, nos embarcamos en la búsqueda de su relevancia para la activación ovocitaria. Considerando que este evento ocurre en forma muy temprana luego de la fusión con el espermatozoide, una opción era que estuviera involucrado en la prevención de la polispermia. No obstante, esta opción fue descartada dado que, a diferencia de la fertilización, la activación con Sr^{2+} no produciría bloqueo a nivel de la membrana (Gardner y Evans, 2006). Por otro lado, el hecho de que PS se exponga específicamente en los sitios de fusión de los GC en la membrana, con una distribución espacio-temporal similar (ver Fig 1.10), abría la posibilidad de una asociación funcional entre ambos eventos. En este sentido, tal como se mencionó en la Introducción, en células cromafines la exposición de PS mediada por la escramblasa PLSCR1 regularía la endocitosis compensatoria (EC) (Ory et al., 2013) luego de la exocitosis masiva de neurotransmisores. Más aún, la EC ha sido descrita como un mecanismo homeostático de membrana en ovocitos de erizo de mar y *Xenopus* posterior a la exocitosis de GC (Whalley et al., 1995; Bement et al., 2000). Por lo tanto, considerando los fenómenos exocíticos que ocurren durante la activación del ovocito de ratón, la exposición de PS podría estar asociada a la ocurrencia de EC. Sin embargo, dado que en la literatura no había evidencias de este fenómeno endocítico en el ovocito de mamífero, en primera instancia abordamos su evaluación.

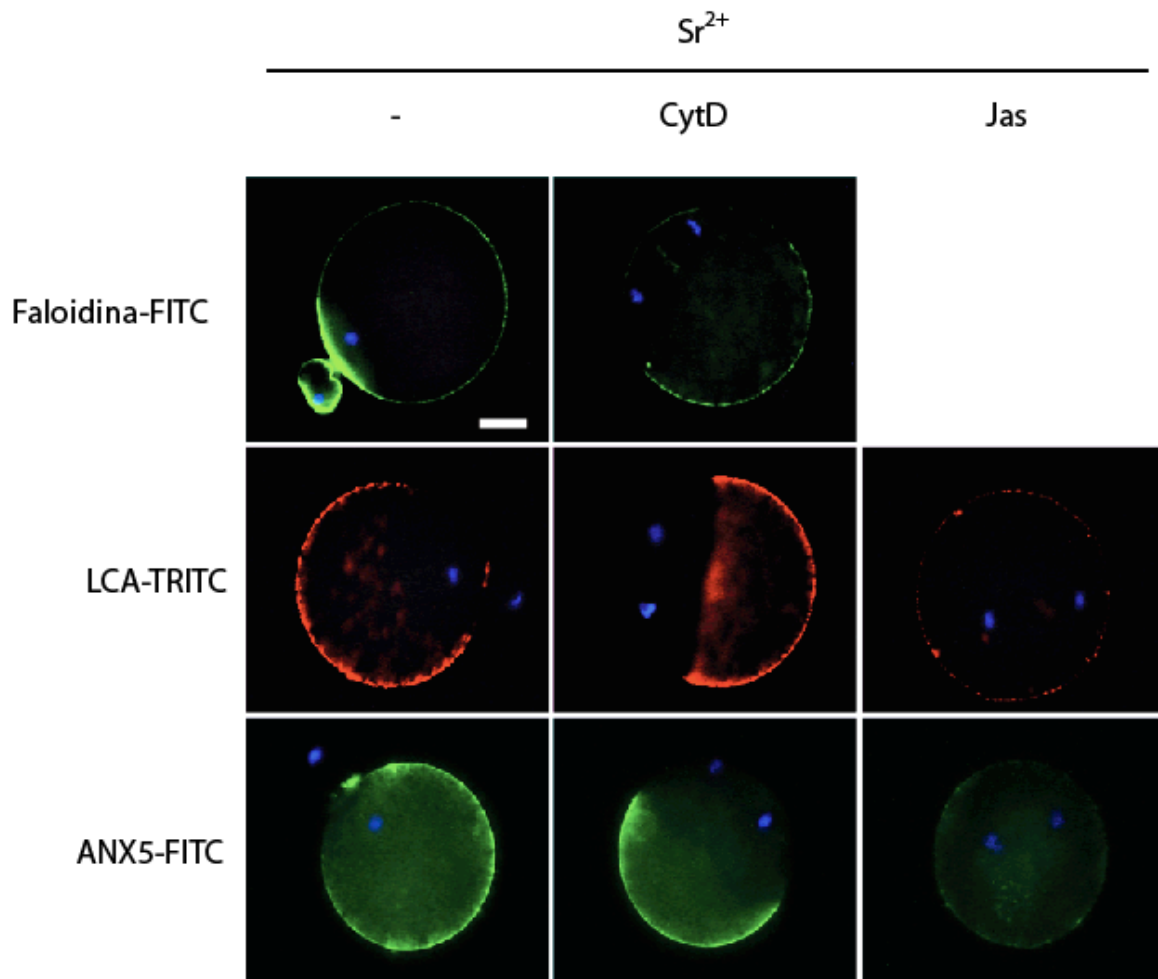


Figura 1.12 Efecto de inhibidores del citoesqueleto de actina sobre la exposición de PS en ovocitos activados. Ovocitos maduros de ratón sin ZP se incubaron en medio (-), en presencia de CytD 10 μ M, o Jas 500 μ M por 1 hora y fueron activados con Sr²⁺ 10 mM por 1 hora adicional. Los ovocitos se dividieron en grupos para evaluar la distribución de actina por marcación con Faloidina-FITC luego de la fijación y permeabilización (excepto en el grupo de Jas); el exudado cortical por tinción con LCA-TRITC; y la ocurrencia de la exposición de PS por tinción con ANX5-FITC. El ADN se marcó con Hoechst 33342. Notar que, a pesar de evidenciarse la reasunción de la meiosis en todos los casos, en presencia de los inhibidores no ocurrió la rotación del huso ni la extrusión del segundo corpúsculo polar. Observar la falta de marcación tanto para LCA-TRITC como para ANX5-FITC en el tratamiento con Jas. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con entre 10 y 15 ovocitos por grupo. Barra: 20 μ m.

Como un primer paso para el estudio y caracterización de la EC, se estableció un sistema de detección que permitiera analizar la reincorporación de la membrana de los GC al citoplasma luego de la exocitosis mediante un ensayo de “pulso y caza”. En este sistema, se empleó nuevamente la lectina LCA fluorescente como herramienta para marcar el exudado cortical en células vivas luego de la activación y visualizar su posible internalización. Previo a estos ensayos, debíamos evaluar la cinética de la exocitosis cortical en respuesta a Sr²⁺, tratando a los ovocitos por diferentes tiempos con SrCl₂ y realizando la

tinción con LCA. La evaluación de esta cinética es clave para los ensayos posteriores, dado que buscábamos establecer el tiempo mínimo necesario para percibir exudado cortical en el oolema, minimizando el tiempo en el cual pudiera haber fenómenos endocíticos tempranos no monitoreados. Los ovocitos MII sin ZP fueron entonces expuestos a SrCl_2 10 mM por diferentes tiempos e incubados con LCA a 4°C, temperatura que inhibe los eventos de tráfico de membrana (Chanaday y Kavalali, 2018), evitando así la internalización prematura de la sonda. Tras la tinción, los ovocitos fueron fijados y se cuantificó la marca fluorescente en el oolema, indicativa de la cantidad de exudado cortical. Observamos que la marca de LCA era detectable en la membrana del ovocito tras 15 minutos de incubación con SrCl_2 , alcanzando un máximo de intensidad a los 30 minutos (Fig. 1.13.a,b). En paralelo, y considerando que es el aumento de calcio quien gatilla los eventos exocíticos, se evaluó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el tratamiento con SrCl_2 en ovocitos sin ZP cargados con la sonda fluorescente Fura-2 AM. Es importante destacar que en estas condiciones la sonda detecta la movilización tanto de Ca^{2+} como de Sr^{2+} dentro del ovocito. Tal como se observa en el registro del cociente de intensidad de fluorescencia por excitación a 340 nm sobre 380 nm (F340/F380), la mayoría de los ovocitos presentaban el primer pico de calcio dentro de los 15 minutos (Fig. 1.13.c), consistente con la presencia de exudado cortical detectado con LCA a este tiempo. En función de los resultados obtenidos para la curva de tiempo de la exocitosis cortical, para los experimentos posteriores se eligió que el tiempo de estímulo con SrCl_2 fuera de 15 minutos.

A continuación, se evaluó la ocurrencia de EC a través de los ensayos de “pulso y caza”. Para ello, luego del estímulo inicial con Sr^{2+} por el tiempo seleccionado (15 minutos), se realizó un pulso con LCA durante 30 minutos a 4°C y una posterior incubación en medio sin lectina a 4 ó 37°C (caza) para permitir la internalización de la sonda (Fig. 1.14.a). Las células luego fueron fijadas y analizadas por microscopía confocal, capturando imágenes de distintos planos de cada ovocito en el eje z. Mientras que luego de la caza a 4°C, temperatura no permisiva para eventos endocíticos (Chanaday y Kavalali, 2018), la marca fluorescente se encontraba concentrada en la membrana plasmática (Fig. 1.14.b), la incubación a 37°C produjo la internalización de la sonda fluorescente en el citoplasma del ovocito (Fig. 1.14.c).

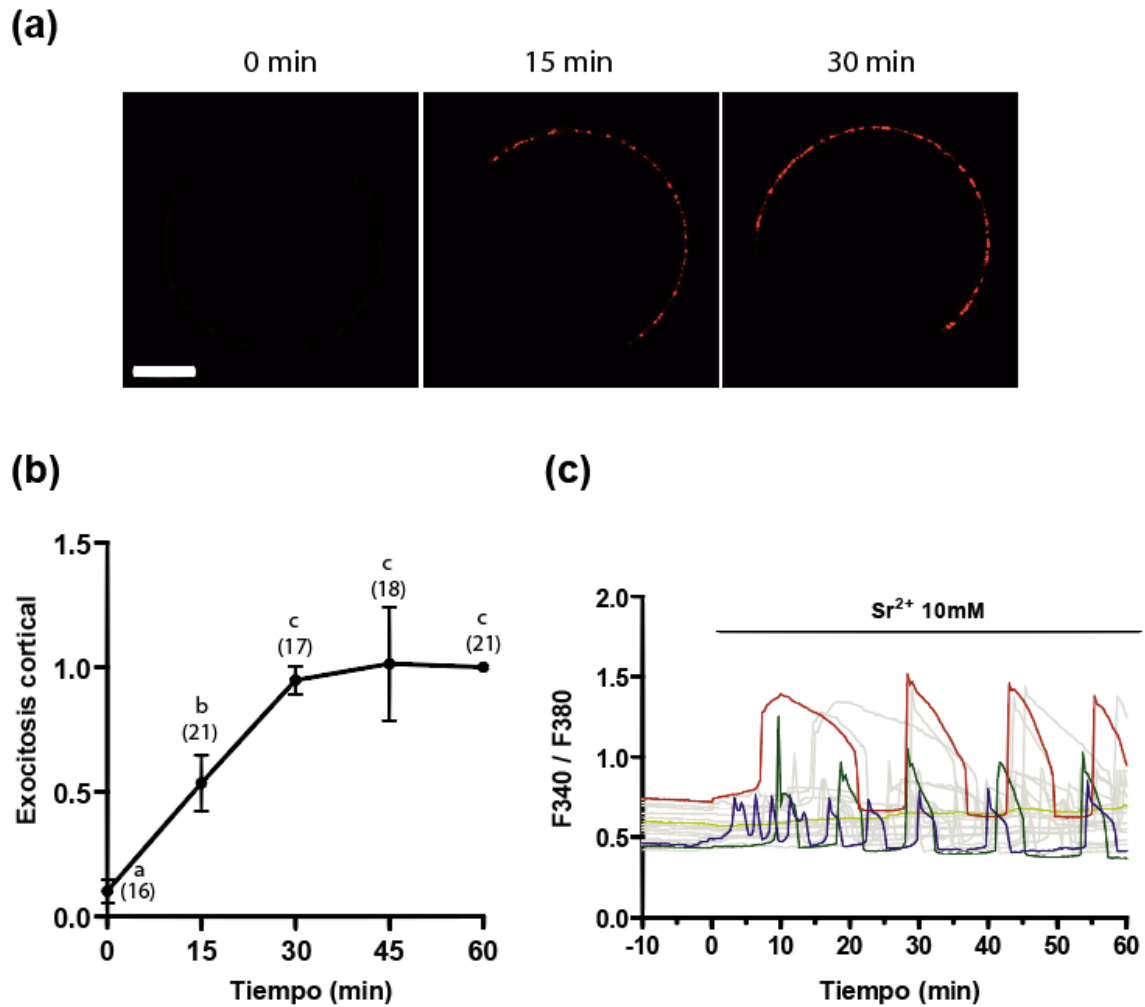


Figura 1.13 Curva de tiempo de la exocitosis cortical por activación con Sr^{2+} . (a) Ovocitos sin ZP fueron incubados con SrCl_2 10mM en un medio sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} por diferentes tiempos, y el exudado cortical se detectó con la sonda LCA-DyLight 649. Las imágenes son representativas de incubaciones a 0, 15 y 30 minutos de estímulo. La zona libre de exudado cortical coincide con la región del oolema que recubre el huso meiótico. Barra = 20 μm . (b) Como una forma de medir la exocitosis de GC, se cuantificó la marca fluorescente en la membrana plasmática por unidad de área utilizando el software FIJI y los valores a distintos tiempos fueron relativizados al promedio de la intensidad de fluorescencia tras 60 minutos de estímulo. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como la media de 3 experimentos independientes \pm SEM. Los puntos con diferentes letras indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). (c) Respuestas de Ca^{2+} representativas inducidas por Sr^{2+} 10 mM en ovocitos sin ZP medidas como el cociente de intensidad de fluorescencia por excitación a 340 nm sobre 380 nm ($\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) de la sonda Fura-2 AM.

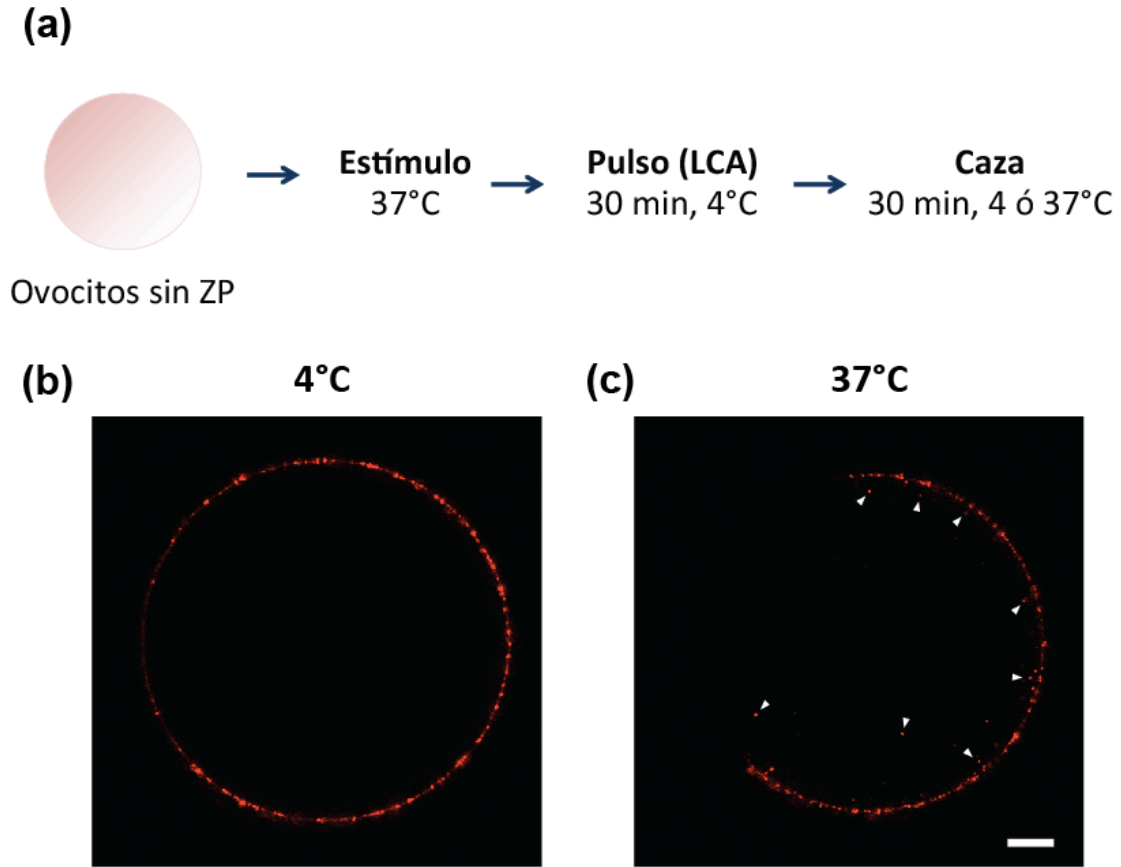


Figura 1.14 Ensayos de pulso y caza. (a) Ovocitos sin ZP se incubaron 15 minutos con SrCl_2 10 mM en un medio sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (estímulo) y se marcaron con LCA-TRITC por 30 minutos a 4°C (pulso). La caza se realizó a 4 (b) o 37°C (c) en un medio sin LCA. Las imágenes corresponden a un plano representativo de un ovocito de cada tratamiento. Notar los puntos fluorescentes internalizados en el panel (c) indicados con puntas de flecha y su ausencia en el panel (b). Barra = 10 μm .

Una vez detectada la internalización de LCA, se registró el número promedio de puntos fluorescentes en el citoplasma por plano focal y se empleó este parámetro como método de cuantificación del fenómeno observado. Los datos obtenidos confirmaron que efectivamente la marca internalizada luego de la caza a 37°C era significativamente mayor que a 4°C (Fig 1.15).

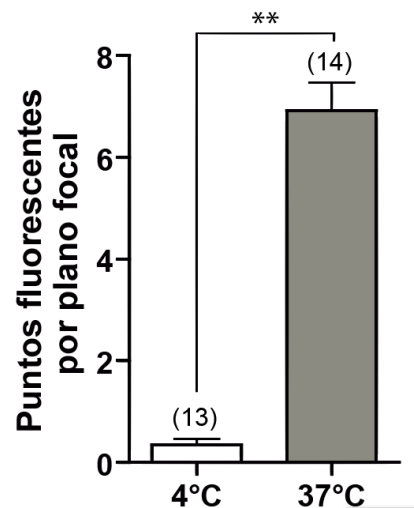


Figura 1.15 Cuantificación de la marca internalizada luego de los ensayos de pulso y caza. Se determinó el número promedio de puntos fluorescentes internalizados por plano focal luego de la caza a 4 ó 37°C. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=4$, $^{**}p<0.01$.

Dado que este fenómeno endocítico en ovocitos murinos resultó un hallazgo novedoso del cual no había evidencias en la bibliografía, decidimos caracterizarlo más profundamente. Sabiendo que la EC en ovocitos de erizo de mar es afectada por inhibidores no específicos de quinasas e inhibidores de calcineurina (Covian-Nares et al., 2008), evaluamos a través de ensayos de pulso y caza el efecto de Staurosporina (Stp, 25 nM) y Ciclosporina A (CsA, 1 μ M), que inhiben quinasas y calcineurina, respectivamente. Para ello, los ovocitos fueron preincubados con los inhibidores, los cuales también se adicionaron en todos los pasos de los ensayos de pulso y caza. Observamos que, si bien el total de marca fluorescente en la membrana luego del pulso era similar en todos los tratamientos (Fig. 1.16.a), indicativo de una similar tasa de exocitosis cortical, la marca internalizada fue significativamente menor en los ovocitos tratados con los inhibidores respecto al control (Fig. 1.16.b). Este resultado sugiere que este fenómeno endocítico podría corresponder a un mecanismo de EC.

Se ha reportado que los filamentos de actina participan de procesos endocíticos en distintos sistemas (Gundelfinger et al., 2003; Sokac y Bement, 2006). Por lo tanto, se evaluó, a continuación, si las modificaciones en el citoesqueleto de actina tenían efectos sobre la internalización de LCA. Para ello, se repitieron los experimentos de pulso y caza en presencia de los disruptores de actina CytD (10 μ M), descripta previamente, y Latrunculina A (LatA, 10 μ M), que resulta un inhibidor más potente de la polimerización de los

filamentos ya que secuestra los monómeros de G-actina (Morton et al., 2000). Si bien CytD había demostrado previamente no afectar la exocitosis cortical en ovocitos activados (ver Fig. 1.12), no se podía descartar que este inhibidor retrasara los eventos exocíticos, afectando su detección a tiempos de estímulo cortos. Por lo tanto, para evitar posibles interferencias de los disruptores de actina sobre la exocitosis de GC, las drogas se adicionaron a partir del pulso a 4°C. En primer lugar, observamos que LatA, en forma similar a lo observado previamente por tratamiento con CytD (Fig. 1.12), produjo la despolimerización masiva de actina (Fig 1.17.a) y la disrupción en la rotación del huso y en la emisión del segundo corpúsculo polar (Fig. 1.17.b). Asimismo, ambos inhibidores provocaron una dramática disminución en la cantidad relativa de marca internalizada luego de los ensayos de pulso y caza (Fig. 1.17.c), sugiriendo que la EC en ovocitos es fuertemente dependiente de la dinámica del citoesqueleto.

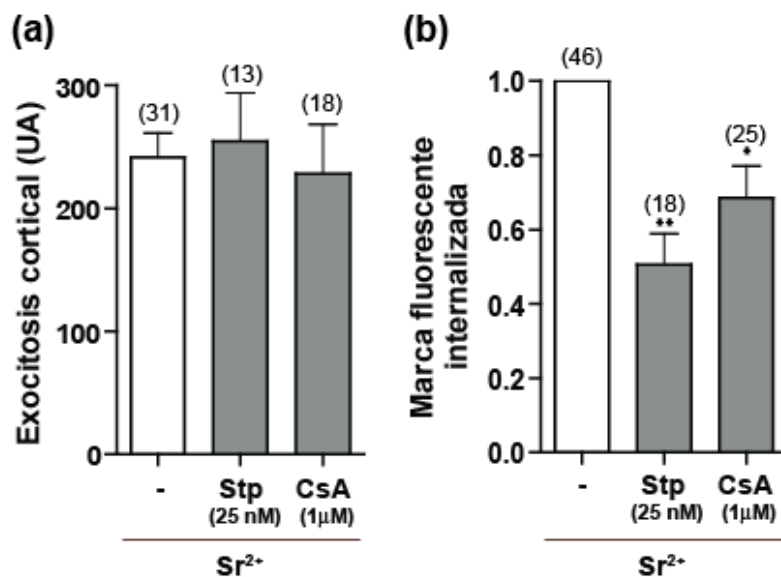


Figura 1.16 Ensayos de pulso y caza en presencia de inhibidores de EC. Ovocitos sin ZP fueron preincubados en ausencia (-) o presencia de Srp 25 nM o CsA 1 μM por 15 minutos. Los inhibidores también se agregaron durante el estímulo con Sr^{2+} (15 minutos), el pulso (30 minutos, 4°C) y la caza (30 minutos). La exocitosis cortical fue medida como la intensidad de fluorescencia en la membrana por unidad de área luego del pulso (a) y se determinó el número de puntos fluorescentes por plano focal luego de la caza, relativizado al control (b). Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n_{(-)}=8$; $n_{(Srp)}=n_{(CsA)}=4$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis.

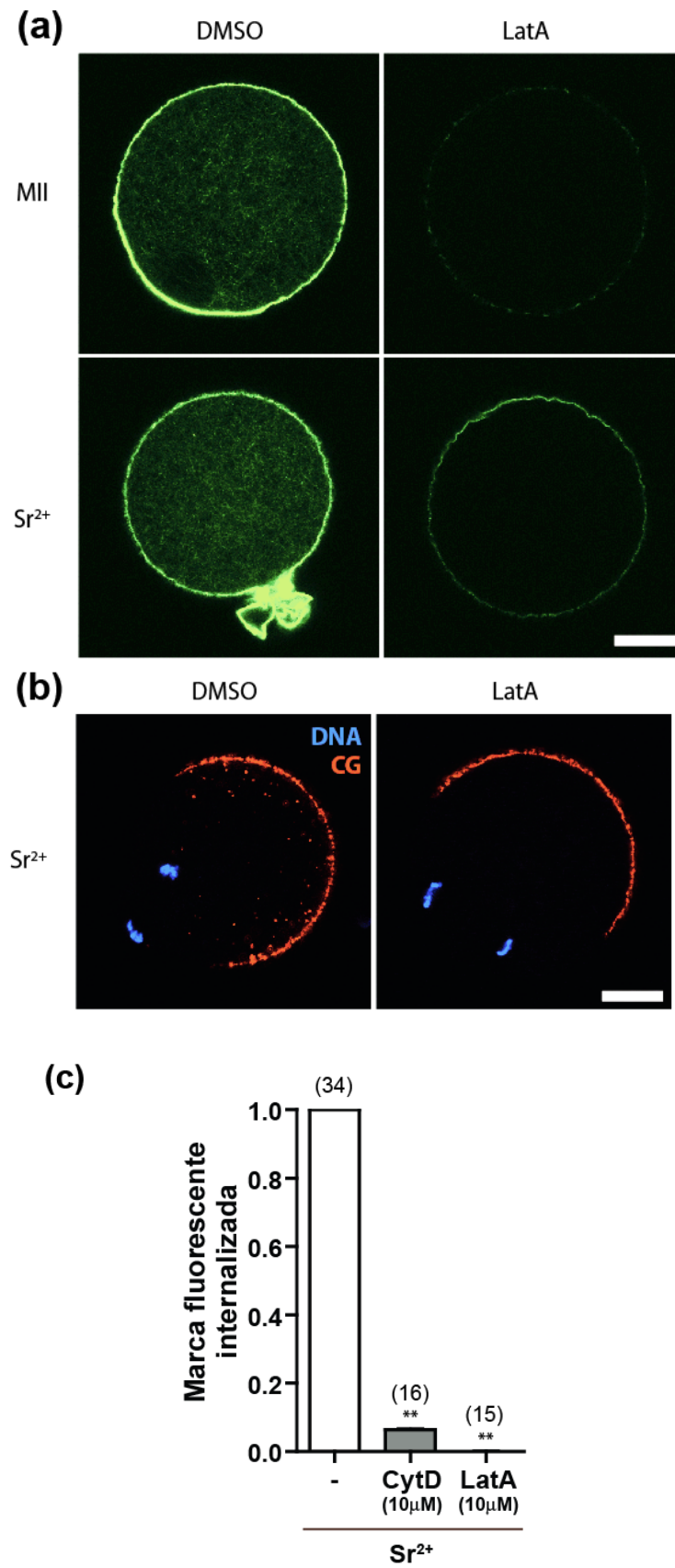


Figura 1.17 Ensayos de pulso y caza en presencia de disruptores de actina. Ver detalle en siguiente página.

Figura 1.17 Ensayos de pulso y caza en presencia de disruptores de actina. Ovocitos MII o estimulados con SrCl_2 10mM por 15 minutos fueron tratados con CytD 10 μM , LatA 10 μM o DMSO (-, control) durante los experimentos de pulso y caza, fijados y teñidos con Hoechst 33342 para visualizar el ADN. (a) Evaluación de la distribución de actina en presencia de LatA. Para ello, algunos ovocitos fueron permeabilizados y teñidos con Faloidina Acti-stain 488. Notar la menor marcación fluorescente en los ovocitos tratados con el disruptor de actina. (b) Disrupción de la extrusión del segundo corpúsculo polar en presencia de LatA. Se observan imágenes representativas luego de la caza a 37°C. Notar que, en presencia de LatA, la reasunción de la meiosis ocurre sin la rotación del huso ni la emisión del segundo corpúsculo polar. En el caso de los paneles (a) y (b), las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes en el que se evaluaron entre 5 y 10 ovocitos por grupo. Barra = 20 μm . (c) Luego de los ensayos agregando los inhibidores durante el pulso y la caza, se determinó el número de puntos fluorescentes internalizados relativizado al control. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=3$, $**p<0.01$.

Se sabe además que existen diversas vías endocíticas sensibles a la depleción del colesterol de la membrana plasmática, por disrupción de las caveolas en “rafts” lipídicos (Schnitzer et al., 1994; Lamaze y Schmid, 1995; Kiss y Botos, 2009). Por lo tanto, para evaluar si la EC es dependiente de esta vía de señalización, se examinó el efecto de la adición de Filipina (5 μM) durante el pulso y la caza. Se ha descrito que este compuesto se une al colesterol en la membrana e inhibe la endocitosis mediada por caveolas (Lamaze y Schmid, 1995; Orlandi y Fishman, 1998). En este caso, los resultados no mostraron diferencias en el número relativo de puntos fluorescentes en los ovocitos tratados con filipina respecto a los controles (Fig. 1.18).

Ha sido reportado en diversos sistemas que la internalización de vesículas endocíticas es dependiente de su recubrimiento con clatrina para su posterior invaginación (Gundelfinger et al., 2003; Milosevic, 2018). Es por ello que evaluamos si este recubrimiento era necesario para la EC detectada en el ovocito murino. Para ello, realizamos nuevamente los ensayos de internalización de LCA, adicionando durante el pulso y la caza al compuesto PitStop 2 (15 μM), el cual bloquea el dominio N-terminal de clatrina, crítico para su función (Von Kleist et al., 2011). La presencia del inhibidor, sin embargo, no produjo una reducción en la marca internalizada respecto al control (Fig. 1.19), sugiriendo que esta endocitosis no sería dependiente de clatrina.

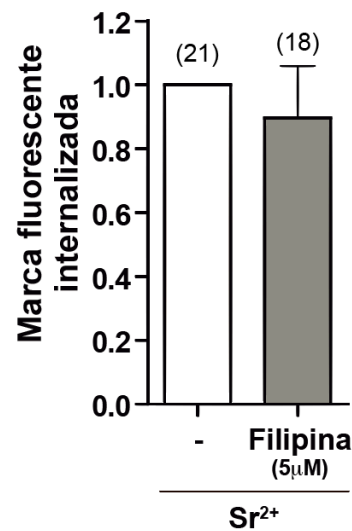


Figura 1.18 Ensayos de pulso y caza en presencia de un inhibidor de endocitosis mediada por caveolas. Ovocitos MII o activados con 10mM Sr²⁺ por 15 minutos fueron tratados con Filipina 5 μM o DMSO (-, control) durante los pasos de pulso y caza, fijados y analizados por microscopía confocal. Se determinó el número de puntos fluorescentes internalizados relativizado al control. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media ± SEM, n=3.

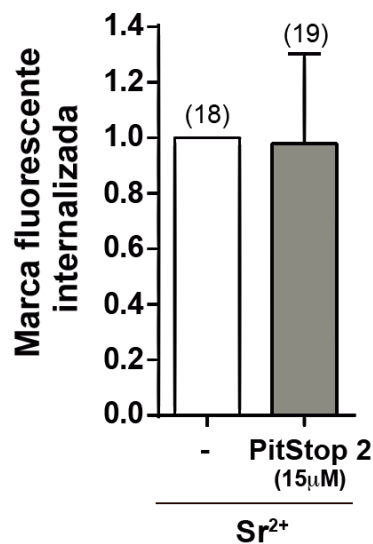


Figura 1.19 Ensayos de pulso y caza en presencia de un inhibidor de clatrina. Ovocitos MII o activados con 10mM Sr²⁺ por 15 minutos fueron tratados con PitStop 2 15 μM o DMSO (-, control) durante los pasos de pulso y caza, fijados y analizados por microscopía confocal. Se determinó el número de puntos fluorescentes internalizados relativizado al control. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media ± SEM, n=3.

Finalmente, se evaluó la participación de dinamina, GTPasa que estaría involucrada en la liberación de las vesículas endocíticas de la membrana plasmática (Stowell et al., 1999; Holroyd et al., 2002). En este caso, los ensayos de EC se llevaron a cabo en presencia de Dynasore (80 μ M), inhibidor de la actividad de dinamina (Macia et al., 2006), durante las etapas de pulso y caza. Los resultados mostraron que la presencia de Dynasore redujo significativamente la cantidad de sonda internalizada respecto al control (Fig. 1.20), sugiriendo la participación de esta GTPasa en la endocitosis aquí descrita.

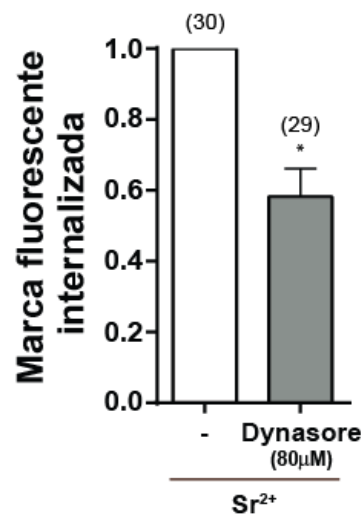


Figura 1.20 Ensayos de pulso y caza en presencia de un inhibidor de dinamina. Ovocitos MII o activados con 10mM Sr^{2+} por 15 minutos fueron tratados con Dynasore 80 μ M o DMSO (-,control) durante los pasos de pulso y caza, fijados y analizados por microscopía confocal. Se determinó el número de puntos fluorescentes internalizados relativizado al control. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=3$, * $p<0.05$.

A pesar de que la activación partenogenética con Sr^{2+} se asemeja a la inducida por el espermatozoide fertilizante (Kline y Kline, 1992a), nos propusimos evaluar a continuación si la EC ocurría en forma fisiológica en ovocitos fertilizados. En este caso, por lo tanto, el estímulo en los ensayos de pulso y caza (ver esquema en Fig. 1.14.a) fue el espermatozoide. Primeramente, se evaluó si 15 minutos de co-incubación de los ovocitos sin ZP con espermatozoides capacitados era suficiente para detectar la exocitosis cortical, tal como se describió con Sr^{2+} (ver Fig. 1.13). Es importante destacar que, en caso de ocurrir la fusión, en estas condiciones no sería posible detectar la incorporación de la cabeza del espermatozoide o su descondensación en el citoplasma del ovocito, ya que estos eventos requieren de tiempos más largos para su detección por tinción del ADN. Por lo tanto, considerando que la exocitosis de GC comienza rápidamente luego de la fusión de gametas

(Ducibella et al., 2002), la presencia de exudado cortical en el oolema podría ser indicio de que ese ovocito ha sido fertilizado. En nuestro caso, observamos que, tras 15 minutos de co-incubación de gametas, la mayoría de los ovocitos de la gota de inseminación presentaban marcación para LCA en la membrana plasmática (Fig 1.21). Se observó, además, que estos ovocitos presentaban al menos un espermatozoide unido a su membrana. En contraposición, en la misma gota había otros que carecían totalmente de marca (Fig. 1.21), al igual que ocurrió en los controles no inseminados. En base a ello, consideramos que, en las condiciones ensayadas, la exocitosis cortical no ocurría en forma espontánea, sino que sería gatillada por la fusión con un espermatozoide. Para los ensayos subsiguientes, por lo tanto, consideramos fertilizados únicamente a aquellos ovocitos con marcación intensa del exudado cortical, tal como se observa en la Figura 1.21.

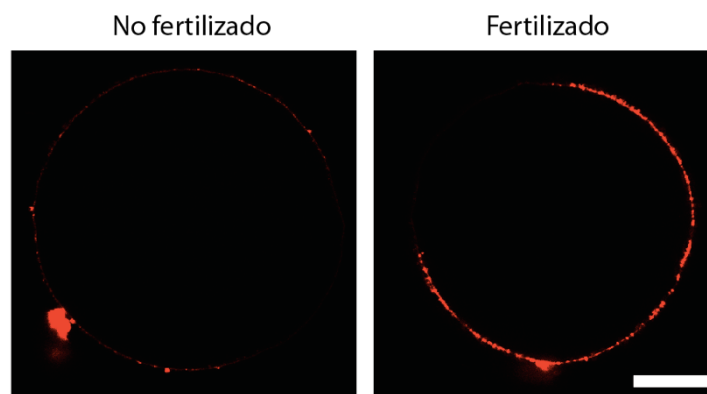


Figura 1.21 Detección del exudado cortical en ovocitos co-incubados con espermatozoides. Ovocitos sin ZP fueron incubados por 15 minutos con espermatozoides capacitados de ratón y se marcaron con LCA-TRITC por 30 minutos a 4°C. Las imágenes corresponden a un plano representativo de un ovocito con ausencia (considerado no fertilizado) o presencia (considerado fertilizado) de marca positiva de LCA en la membrana. Barra = 20 μm .

Sobre ovocitos co-incubados por 15 minutos con espermatozoides capacitados (estímulo) se realizaron los ensayos de pulso y caza, tal como se describió previamente. Luego de la caza a 37°C, evidenciamos un gran número de puntos fluorescentes en el citoplasma del ovocito, indicando la internalización de la sonda, a diferencia de lo observado en los ovocitos cuya caza se había realizado a 4°C (Fig. 1.22). Es interesante resaltar en este caso que los ovocitos fertilizados presentaban un número de puntos fluorescentes por plano focal similar al de los tratados con SrCl_2 (comparar Fig. 1.15 y 1.22). Durante estos ensayos, por otro lado, algunos ovocitos fueron incubados en presencia de Stp, que, tal como se mostró previamente, inhibía la EC en ovocitos activados con Sr^{2+} (ver Fig. 1.16). En estas condiciones, el número de puntos fluorescentes por plano focal resultó

ser significativamente menor al control (Fig. 1.22). En conjunto, los experimentos de fusión apoyan la existencia de un fenómeno endocítico fisiológico luego de la fertilización, que correspondería a un mecanismo de EC.

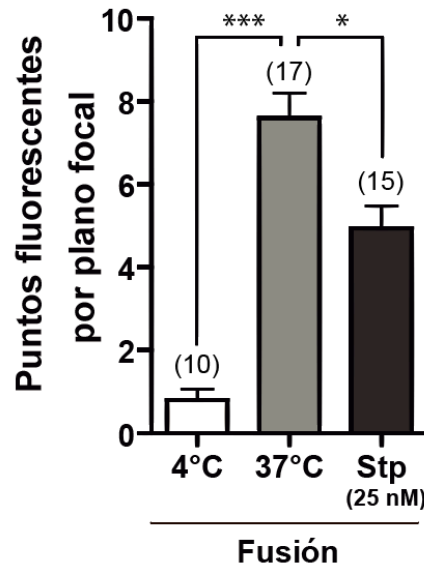


Figura 1.22 Ensayos de pulso y caza en ovocitos fertilizados. Ovocitos sin ZP fueron incubados por 15 minutos con espermatozoides capacitados de ratón y sometidos a ensayos de pulso y caza a 4 ó 37°C. En paralelo, algunos ovocitos fueron preincubados por 15 minutos en presencia de Stp 25nM, que también se agregó en los siguientes pasos. Se determinó el número de puntos fluorescentes por plano focal luego de la caza. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media ± SEM, n=3, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Una vez caracterizada la EC en ovocitos murinos, se procedió a evaluar si la misma estaba funcionalmente asociada a la exposición de PS observada durante la activación. Para ello, y considerando que se ha detectado *Plscr1* en ovocitos (Curia, 2011), utilizamos un abordaje experimental similar al descrito en células cromafines, en las cuales la exposición de PS regulada por la escramblasa PLSCR1 estaría funcionalmente asociada a la EC (Ory et al., 2013). La estrategia consistió en expresar en ovocitos una variante mutada de PLSCR1 insensible al calcio, incapaz de movilizar PS, que se comporta como dominante negativa (Zhao et al., 1998). Por lo tanto, de haber una asociación directa entre la translocación de PS y la EC, la activación de los ovocitos expresando PLSCR1 mutante debería producir una menor internalización de LCA respecto a los controles con PLSCR1 salvaje.

Dado que la introducción de material genético en ovocitos no puede ser realizada por transfección de ADN debido a que los mismos son transcripcionalmente inactivos, nos

propusimos inducir la expresión de PLSCR1 a través de la microinyección de ARN, método habitualmente utilizado en este tipo celular. En primer lugar, se procedió a subclonar las secuencias salvaje (WT) y mutante (Mut) de *Plscr1* a vectores de transcripción *in vitro* para la posterior obtención de ARN. Las mismas se encontraban inicialmente en plásmidos pEGFP-C2 (Clontech, CA, EEUU), gentilmente donados por el laboratorio del Dr. Gasman. Sin embargo, debido a inconsistencias en las publicaciones donde se reportó su expresión (Zhao et al., 1998; Zhou et al., 1998), se desconocía exactamente si la secuencia de *Plscr1* con la que contábamos codificaba para la proteína humana o la murina. Para conocer esta información, luego de la amplificación de los plásmidos a través de cultivos bacterianos, se realizó una PCR sobre el ADN plasmídico utilizando primers específicos diseñados para las secuencia correspondientes a ambas especies. De esta forma, detectamos que únicamente los primers para *Plscr1* murina (*mPlscr1*), a diferencia de los de la humana (*hPlscr1*), amplificaban un fragmento de alrededor de 1000 pb, consistente con el tamaño esperado (Fig 1.23). Estos resultados fueron posteriormente corroborados por secuenciación del ADN.

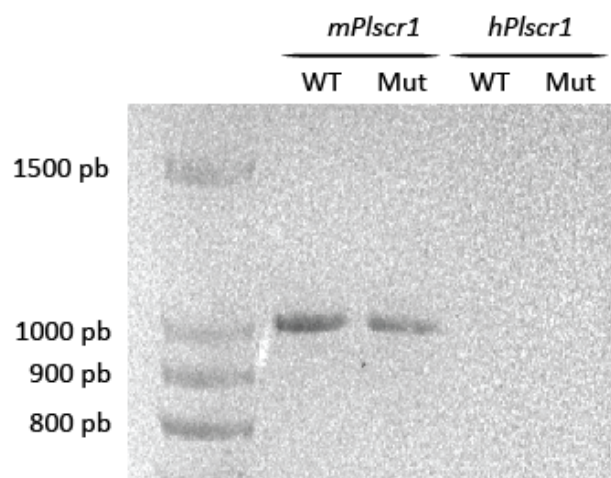


Figura 1.23 Análisis de la presencia de *Plscr1* murina y humana en los plásmidos de origen. Se realizó una PCR empleando como molde a los plásmidos de origen conteniendo la secuencia salvaje (WT) o mutante (Mut) y primers específicos para *mPlscr1* y *hPlscr1*. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. El tamaño esperado para los fragmentos era de 987pb (*mPlscr1*) y 945pb (*hPlscr1*).

La secuenciación además brindó la posición exacta de *Plscr1* en los vectores, indicando que se encontraba flanqueada por los sitios de corte para BglII y EcoRI (Fig 1.24), y confirmó la presencia de la mutación puntual en la posición 284 de la variante Mut, con

un residuo de alanina en lugar de ácido aspártico, y que pertenece al sitio de unión de calcio en la proteína (Zhou et al., 1998).

Como ya se mencionó, la secuencia correspondiente a *Plscr1* debía ser subclonada a un vector de transcripción *in vitro*. Contábamos para ello con dos vectores diferentes: Venus-N-pCDNA6B (Invitrogen, CA, EEUU) y pIVt-kozak-3xflag (Schindler y Schultz, 2009) (Fig 1.24), gentilmente donados por los laboratorios del Dr. Fissore y del Dr. Schultz, respectivamente. El primer vector permite la expresión de PLSCR1 fusionada con la proteína Venus en su extremo amino terminal. La microinyección de esta forma fluorescente permitiría visualizar su localización luego de ser expresada. Para los estudios funcionales, sin embargo, esta variante no podía ser empleada debido a que Venus emite en longitudes de onda cercanas a la sonda ANX5-FITC. Para esos ensayos, por lo tanto, se emplearía PLSCR1 sin etiqueta fluorescente, generada a partir del segundo plásmido.

Dado que los vectores de origen y destino no compartían sitios de restricción para el subclonado, que no cortaran también la secuencia en cuestión, fue necesario llevar a cabo una estrategia alternativa. Si bien se evaluaron distintos abordajes experimentales, aquel con el que se logró el cometido consistió en aislar el fragmento deseado con enzimas de restricción y generar extremos romos para luego insertarlo en los plásmidos deseados (ver diseño experimental en Fig 1.24). Para cada caso, se seleccionaron los plásmidos de destino conteniendo *Plscr1* en el sentido correcto para su expresión.

Una vez obtenidos los 4 plásmidos individuales, se linealizaron para su posterior transcripción *in vitro*. En el caso del vector Venus-N-pCDNA6B se debió agregar además una cola de poli(A), que no estaba incluida en el transcripto original. Se observó que el ARN de los transcriptos obtenidos, correspondientes a *Plscr1* WT y Mut fusionados o no a Venus, se encontraban puros y tenían el tamaño esperado (1.7-1.9 kpb) (Fig. 1.25).

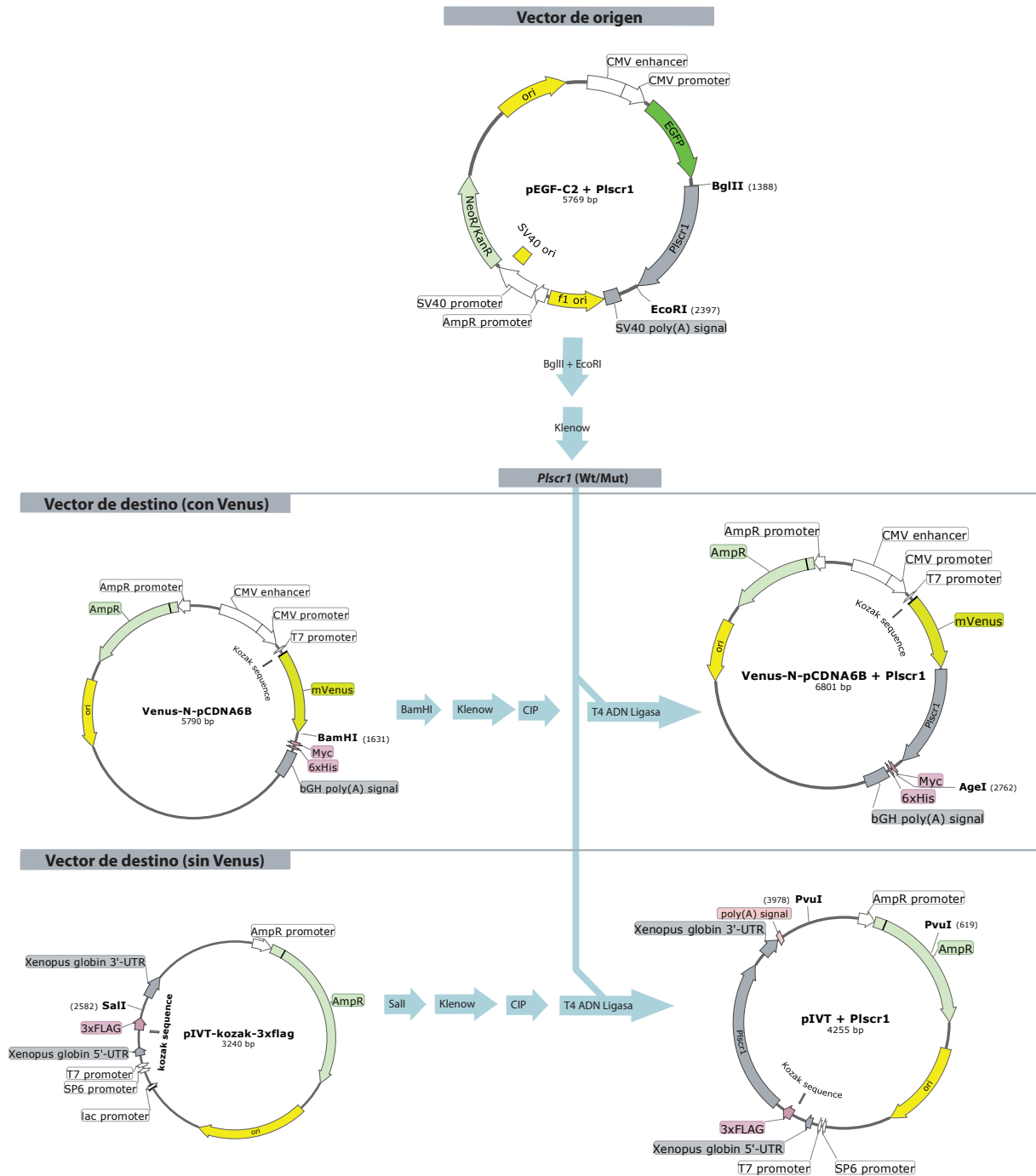


Figura 1.24 Estrategia para subclonar *Plscr1* en plásmidos de transcripción *in vitro*. Los plásmidos de origen pEGF-C2 conteniendo las variantes WT y Mut de *Plscr1* (arriba) fueron digeridos con las enzimas de restricción BglIII y EcoRI y tratados posteriormente con el fragmento Klenow de la polimerasa I en presencia de dNTPS. Los fragmentos de ADN conteniendo las secuencias de *Plscr1* fueron purificados de gel de agarosa. Por otro lado, los plásmidos de destino Venus-N-pCDNA6B y pIVT-kozak-3xflag (izquierda) fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y Sall, respectivamente, y tratados con el fragmento Klenow para generar extremos romos y la fosfatasa alcalina CIP para desfosforilarlos. Luego de la purificación por gel de agarosa, los insertos y los plásmidos abiertos fueron ligados con T4 DNA Ligasa, obteniéndose los vectores representados a la derecha.

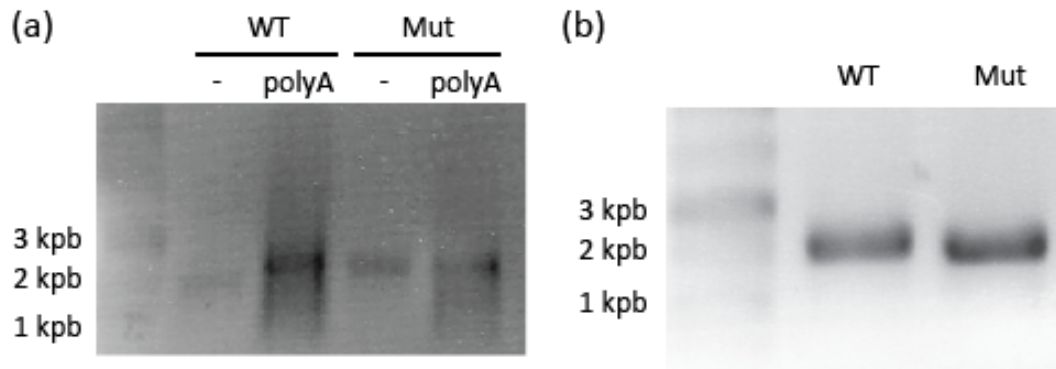


Figura 1.25 ARN correspondiente a las variantes de *Plscr1*. Los transcritos obtenidos a partir de los vectores Venus-N-pCDNA6B (a) y pIVt-kozak-3xflag (b) se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. En el caso de la variante fusionada a Venus (a), se observan los transcritos antes (-) y después de la poliadenilación (polyA). Todos los transcritos obtenidos tenían el tamaño esperado (1.7-1.9 kpb).

Luego de haber obtenido exitosamente los ARN, se procedió a la microinyección de los mismos. Las microinyecciones inicialmente se realizaron sobre ovocitos inmaduros (en estadio de vesícula germinal) dado que son menos propensos al envejecimiento *in vitro* respecto a los maduros, lo que permite su incubación por varias horas para que ocurra la traducción del ARN. Estos ovocitos además pueden ser madurados *in vitro* para su posterior activación.

Dado que las proteínas expresadas debían dirigirse al oolema tal como se espera por su actividad escramblasa, en primer lugar se evaluó la localización de las variantes de PLSCR1 fusionadas a Venus. Doce horas después de la microinyección de los transcritos WT o Mut, observamos que la mayoría de los ovocitos de ambos tratamientos presentaba marca fluorescente concentrada en la membrana plasmática (Fig. 1.26), indicando la correcta localización de las proteínas expresadas. En cada grupo, algunos ovocitos no presentaron marca fluorescente, lo que pudo deberse a una incorrecta o insuficiente inyección de ARN.

Una vez comprobado que la proteína se expresaba y localizaba correctamente en los ovocitos de ratón, el siguiente paso fue la realización de los ensayos funcionales, es decir, la evaluación de la translocación de PS y, posteriormente, la ocurrencia de EC. Experimentos previos a la microinyección, sin embargo, pusieron en evidencia que los ovocitos inmaduros de ratón unían a su membrana ANX5-FITC en ausencia de cualquier estímulo adicional. Más aún, luego de la maduración *in vitro* esta marcación seguía

detectándose en todo el oolema, probablemente debido a la presencia de restos de membrana, consecuencia de la ruptura mecánica de las uniones “gap” con las células de la granulosa. Por lo tanto, los ovocitos inmaduros no podrían ser empleados para los ensayos funcionales con ANX5-FITC, por lo que debimos continuar el trabajo con ovocitos ovulados (MII).

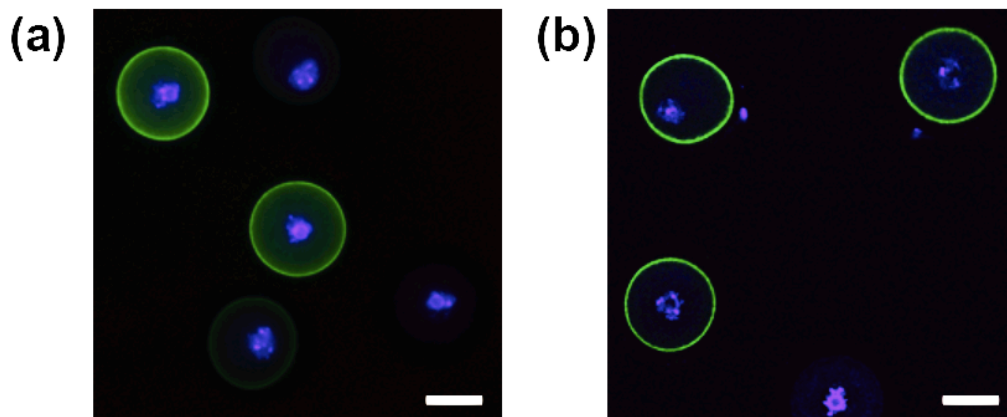


Figura 1.26 Localización de PLSCR1 en ovocitos inmaduros. Ovocitos inmaduros fueron inyectados con 0.5 µg/µl de *Plscr1* WT (a) o Mut (b) fusionadas a Venus (verde) e incubados en presencia de IBMX 100 µM por 12 horas. El ADN se encuentra teñido con Hoechst 33342 (azul). Notar que en presencia de IBMX los ovocitos se mantienen arrestados en estadio de vesícula germinal. Barra = 50 µm.

Al utilizar ovocitos MII es importante destacar que los mismos son sensibles al envejecimiento *in vitro* (Webb et al., 1986; O'Neill y Kaufman, 1988). En este sentido, luego de la microinyección de ARN, son necesarias varias horas en cultivo para la expresión e inserción de las proteínas en la membrana. Considerando entonces que para los ensayos funcionales los ovocitos inyectados deberían ser posteriormente capaces de activarse, se determinó el tiempo mínimo requerido para la detección de PLSCR1 en el oolema por microinyección de las variantes fluorescentes. En este caso, los ovocitos fueron monitoreados por microscopía de epifluorescencia luego de la microinyección. Se evidenció que, si bien la marca fluorescente se encontraba difusa en el citoplasma, a partir de las 6 horas de incubación la mayoría de los ovocitos presentaba además marca localizada en el oolema (Fig. 1.27). Por lo tanto, éste fue el tiempo elegido en los experimentos subsiguientes para permitir la expresión de PLSCR1.

A continuación, nos propusimos realizar la evaluación funcional de las proteínas expresadas en ovocitos MII, a través de su capacidad de translocar PS en el oolema durante

la activación. Tal como se mencionó previamente, la presencia de PLSCR1 Mut debería impedir la externalización de PS en los ovocitos activados. Para estos estudios, los ovocitos fueron microinyectados con las secuencias no fluorescentes, incubados por 6 horas para favorecer la expresión de PLSCR1 y luego activados con Sr^{2+} . Como controles, algunos ovocitos no fueron inyectados, y, por otro lado, tras cada microinyección, se dejaron células sin activar (MII). La correcta activación de los ovocitos se verificó por presencia del segundo corpúsculo polar y ocurrencia de la exocitosis cortical, cuantificada a través de la marcación del exudado por tinción con LCA, y la exposición de PS se monitoreó por incubación con ANX5-FITC.

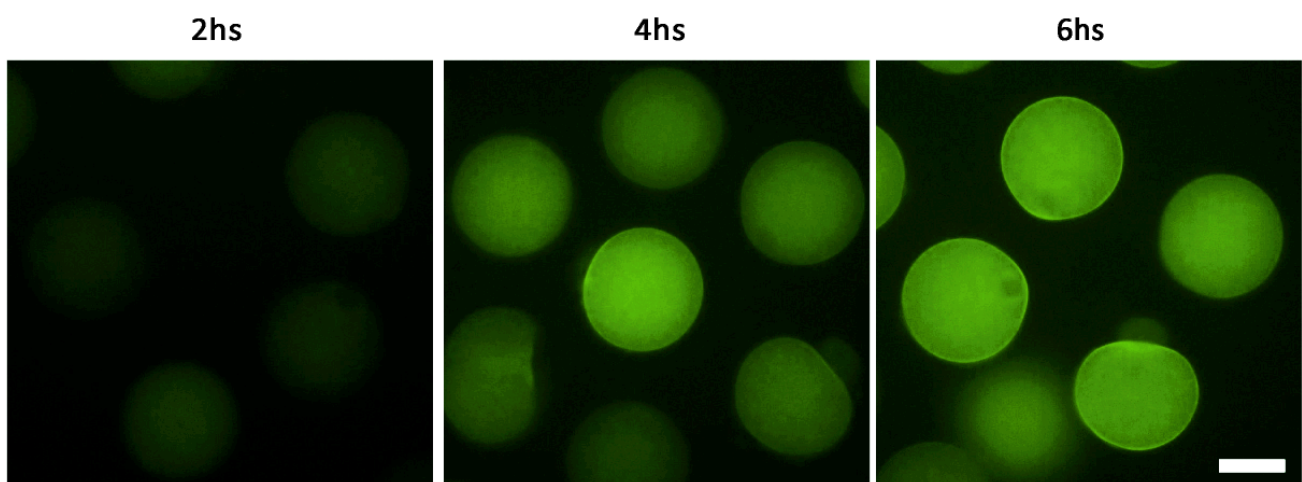


Figura 1.27 Localización de PLSCR1 en ovocitos maduros. Ovocitos MII fueron inyectados con $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de *Plscr1* WT fusionada a Venus (verde) y se evaluó la fluorescencia cada 2 horas. Notar que, luego de 6 horas de incubación, se evidencia marca fluorescente en el oolema. Barra = $50 \mu\text{m}$.

En estas condiciones experimentales, la mayoría de los ovocitos tratados con SrCl_2 (inyectados o no) extrudaron el segundo corpúsculo polar. Tras el análisis de las imágenes colectadas por microscopía confocal, pudimos observar que, en todos los tratamientos, la activación produjo una marcación intensa del exudado cortical en la membrana, no detectable en ovocitos MII (Fig. 1.28.a). Esto nos indicó que la exocitosis ocurría normalmente luego de la activación, independientemente de la expresión de las distintas variantes de PLSCR1, y que la micromanipulación *per se* no gatillaba la exocitosis en ovocitos MII. A diferencia de lo que esperábamos, sin embargo, la exposición de PS ocurrió en igual magnitud luego de la activación en todas las condiciones evaluadas, incluso inyectando la forma mutante de *Plscr1* (Fig 1.28.b). Por lo tanto, los ovocitos expresando PLSCR1 Mut translocaban normalmente PS en el oolema luego de la activación.

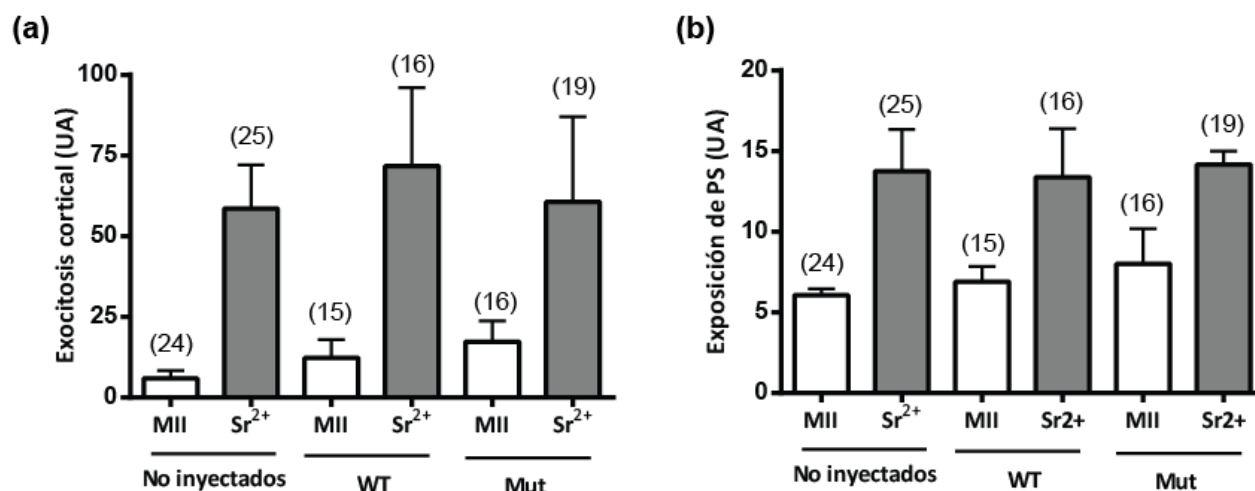


Figura 1.28 Evaluación de la exocitosis cortical y la exposición de PS en ovocitos activados microinyectados con *Plscr1* salvaje (WT) o mutante (Mut). Ovocitos MII fueron inyectados con 0.5 µg/µl de las variantes WT o Mut de *Plscr1*, o no inyectados (control). Luego de 6 horas, se activaron por 1 hora con Sr²⁺ 10 mM y se determinó la magnitud de la exocitosis cortical por tinción con LCA-DyLight 649 (a) y de la exposición de PS por tinción con ANX5-FITC (b). El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media ± SEM, n=3. Dentro de cada tratamiento (MI o Sr²⁺) no hay diferencias significativas en el parámetro medido.

El hecho de que la forma mutante de PLSCR1 no impidiera la exposición de PS en ovocitos podía ser consecuencia de la presencia de otras proteínas que pudieran compensar esta función. En este sentido, se ha descrito que la proteína transmembrana TMEM16F presenta actividad escramblasa dependiente de calcio y sería fundamental para la activación de plaquetas en el proceso de coagulación sanguínea (Suzuki et al., 2010a). Mediante estudios de RT-PCR encontramos que el transcripto *Tmem16f* está presente en ovocitos maduros de ratón (Fig 1.29). Por lo tanto, ésta proteína podría contribuir a la translocación de PS en ovocitos activados.

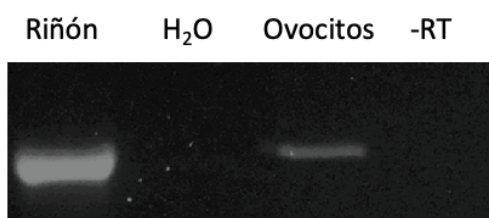


Figura 1.29 Análisis de la expresión de *Tmem16f* en ovocitos murinos. El ADNc proveniente del ARN extraído de ovocitos maduros de ratón fue utilizado como molde en una PCR empleándose primers específicos para *Tmem16f*. El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó el producto de PCR de riñón como control positivo, y los productos sin molde (H₂O) o sin haber realizado la retrotranscripción (-RT) como controles negativos.

El hecho de no poder inhibir la exposición de PS en ovocitos activados mediante la estrategia de microinyección impidió realizar posteriores estudios para evaluar su asociación funcional con la EC. Sin embargo, sirviéndonos de que la activación con el ionóforo A23187 en ausencia de calcio extracelular no provoca la exposición de PS en el oolema, tal como se mostró previamente (ver Fig 1.6), nos propusimos como abordaje alternativo estudiar la ocurrencia de EC en ovocitos activados de esta manera. Para esta estrategia, se repitió el ensayo de pulso y caza utilizando como estímulo 5 minutos de incubación en presencia de A23187 10 μ M. En estas condiciones, el ionóforo indujo la exocitosis cortical en magnitud similar a la producida por el Sr^{2+} (Fig 1.30.a), consistente con lo observado previamente. Sin embargo, la marca internalizada luego de la caza fue significativamente menor frente al estímulo A23187 respecto al de Sr^{2+} (Fig 1.30.b). Este resultado sugiere por primera vez una posible asociación de la EC con la translocación de PS en la membrana durante la activación de ovocitos murinos.

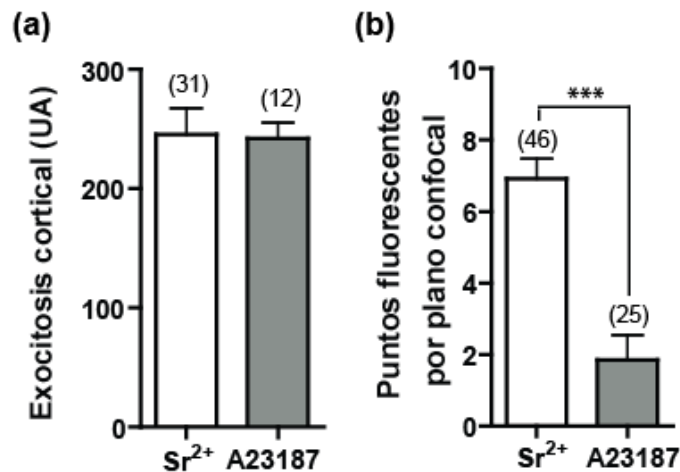


Figura 1.30 Ensayos de pulso y caza en ovocitos activados con A23187. Ovocitos sin ZP fueron incubados por 15 minutos con SrCl_2 10 mM ó 5 minutos con A23187 10 μ M, y sometidos a ensayos de pulso y caza a 37°C. La exocitosis cortical fue medida como la intensidad de fluorescencia en la membrana por unidad de área luego del pulso (a) y se determinó el número de puntos fluorescentes por plano focal luego de la caza (b). El número total de ovocitos evaluados en cada grupo se presenta entre paréntesis. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n_{(\text{Sr}^{2+})}=8$; $n_{(\text{A23187})}=4$, *** $p<0.001$.

DISCUSIÓN

La activación ovocitaria incluye una serie de eventos moleculares que aseguran los primeros pasos para el correcto desarrollo embrionario. Si bien muchos de los mecanismos involucrados han sido descriptos tanto en modelos animales como en el humano, la translocación de PS en la membrana de ovocitos fertilizados de ratón ha resultado un novedoso hallazgo y un posible modulador de la activación. Los resultados de esta Tesis muestran que la exposición de PS en el ovocito es dependiente del aumento de $[Ca^{2+}]_i$, de la entrada de calcio del medio extracelular y de la remodelación del citoesqueleto de actina. Además, los resultados sugieren que esta translocación regularía la EC que ocurre como consecuencia de la exocitosis masiva de GC.

Resultados previos de nuestro grupo indicaban que la exposición de PS ocurría en la membrana de ovocitos fertilizados *in vitro* (Curia, 2011). Si bien la técnica de fertilización *in vitro* hoy en día es ampliamente utilizada y provee excelentes resultados, no era posible descartar que la manipulación de los ovocitos, su incubación en medio de cultivo o la exposición a una gran cantidad de espermatozoides actuaran como agentes estresores, impactando sobre la integridad y la estructura de la membrana. En esta Tesis, observamos que los ovocitos fertilizados *in vivo* luego de un apareo natural también exhibían PS expuesta en su membrana, confirmando que este fenómeno ocurriría en forma fisiológica. Los resultados previos indicaban además que, en ovocitos fertilizados *in vitro*, la marcación para ANX5-FITC inicialmente era evidente en toda la membrana con excepción de la región que recubría el huso meiótico, y 2-3 horas luego de la fusión se perdía en el sitio de entrada del espermatozoide (Curia, 2011). En el caso de los ovocitos fertilizados *in vivo*, la translocación de PS no se detectó en la zona recubriendo la cabeza descondensada del espermatozoide. Por lo tanto, considerando los resultados *in vitro*, esta falta en la marcación con ANX5-FITC podría ser consecuencia de una pérdida de PS expuesta, causada por la incorporación de la membrana plasmática del espermatozoide, la cual ha sido previamente descripta en diferentes especies de mamíferos (Yanagimachi, 1994).

Por otra parte, en los ovocitos fertilizados *in vitro* la translocación ocurría en forma transitoria, evidenciada por una marcación positiva para ANX5-FITC durante el estadio de

pronúcleos (6 horas de co-incubación de gametas), la cual era indetectable a las 24 horas en embriones de 2 células (Curia, 2011). En este sentido, resultados no incluidos en esta Tesis mostraron que cuando la recolección de los ovocitos se realizaba más tarde (10 horas después de ocurrido el apareo) los mismos no presentaban PS expuesta en la membrana, a pesar de encontrarse en estadio de 2 pronúcleos, corroborando el carácter transiente de este fenómeno. En este sentido, se ha descrito que las oscilaciones Ca^{2+} se detienen con la formación de los pronúcleos (Marangos et al., 2003). Como se discutirá más adelante, estos aumentos de Ca^{2+} podrían ser los responsables de activar las escramblasas que translocarían PS hacia el exterior de la bicapa, por lo que el cese de las oscilaciones podría conllevar a la inactivación de estas proteínas y al restablecimiento de la asimetría en la membrana. Las diferencias en la cinética de translocación respecto a los resultados *in vitro* podrían deberse a que los ovocitos recolectados *in vivo* se encontraran en un estadio un poco más avanzado del desarrollo donde los mecanismos para la movilización de PS ya hubieran reestablecido la asimetría. Además, se ha reportado que el desarrollo embrionario *in vitro* es más lento que *in vivo* (Harlow y Quinn, 1982), abriendo la posibilidad de que en este último caso la cinética de exposición de PS sea más rápida.

La activación partenogenética con Sr^{2+} indujo la externalización de PS, indicando que la misma no sería consecuencia directa de la fusión de gametas sino de las vías de señalización gatilladas durante la activación. Se ha descrito que, en un medio carente de otros cationes divalentes, el Sr^{2+} entra a través del canal TRPV3 (Carvacho et al., 2013) y promueve las oscilaciones de Ca^{2+} por acción directa sobre los receptores IP_3R en los reservorios intracelulares (Zhang et al., 2005). Si bien en este caso las oscilaciones ocurren en ausencia de $\text{PLC}\zeta$, se asemejan a las desencadenadas por el espermatozoide fertilizante (Kline y Kline, 1992a) y gatillan la exocitosis de GC (Kline y Kline, 1992a) y la reasunción de la meiosis vía $\text{CAMKII}\gamma$ (Backs et al., 2010). Dado el rol fundamental que cumple el calcio como mensajero intracelular durante la activación ovocitaria, no fue sorprendente que su secuestro mediante el empleo de BAPTA-AM previniera la exposición de PS luego del tratamiento con Sr^{2+} , así como se ha reportado que impide la totalidad de los eventos asociados a la activación (Kline y Kline, 1992a). El hecho de que los ovocitos $\text{CAMKII}\gamma^{-/-}$ tratados con SrCl_2 expusieran PS en su membrana, a pesar de no salir del arresto meiótico, indica que esta translocación es independiente de la reasunción de la detenida meiosis. A

diferencia de estos ovocitos que presentan oscilaciones de Ca^{2+} (Backs et al., 2010), los ovocitos salvajes tratados con TPEN, droga que induce la reasunción de la meiosis en ausencia de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Suzuki et al., 2010b), no exhibieron PS expuesta en el oolema. De esta forma, resulta evidente que este fenómeno estaría gatillado por un mediador río arriba de $\text{CAMKII}\gamma$, y que sería dependiente del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e independiente de las vías asociadas directamente con la reasunción del ciclo celular. Es importante destacar que, tal como se mencionó en la Introducción, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modula la actividad de las proteínas que translocan fosfolípidos, activando las escramblasas e inhibiendo las flipasas (Daleke y Lyles, 2000), e induciendo así la movilización de PS en diferentes tipos celulares (Bever et al., 1999; Pomorski y Menon, 2006; Sahu et al., 2007). Por lo tanto, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el ovocito de ratón como consecuencia de la fertilización/activación podría modular la actividad de las escramblasas y flipasas previamente detectadas en ovocitos (Curia, 2011), resultando en la translocación de PS.

El hecho de que tan sólo 15 minutos de incubación con SrCl_2 fueran suficientes para gatillar la exposición de PS sugiere que éste es un evento temprano en la activación ovocitaria, así como lo es la exocitosis de GC (Ducibella et al., 2002). En este sentido, las mediciones fluorimétricas con Fura-2 AM realizadas en ovocitos sin ZP expuestos a SrCl_2 pusieron en evidencia que las primeras oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ ocurren dentro de los 15 minutos de incubación (ver Fig. 1.13). Estas oscilaciones tempranas, a su vez, podrían ser responsables de la activación de las escramblasas a tiempos tan cortos.

A continuación, se ahondó en el estudio de la participación del calcio, mensajero fundamental de la activación, para la translocación de PS. Para ello, se emplearon múltiples agentes químicos que producen en el ovocito un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por diferentes mecanismos, desencadenando la activación partenogenética, y, posteriormente, se evaluó la exposición de PS. Los resultados, resumidos en la Tabla 1.1, pusieron en evidencia que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ *per se* no era suficiente para que ocurriera la externalización de PS en el oolema. La relevancia de estos resultados para el fenómeno estudiado se discute a continuación.

Estímulo	Patrón del aumento de calcio	Mecanismo de la movilización del calcio	Exposición de PS
Espermatozoide	Oscilaciones (Cuthbertson et al., 1981)	Liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares por acción de IP_3 y posterior influjo de Ca^{2+} a través de los canales $\text{Ca}_v3.2$ y/o TRPM7 (Miyazaki et al., 1992; Bernhardt et al., 2015, 2018)	Sí
SrCl_2 10mM	Oscilaciones (Kline y Kline, 1992a)	Entrada de Sr^{2+} a través de TRPV3 y liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático por acción sobre IP_3R (Carvacho et al., 2013)	Sí
Etanol 7% v/v	Único pico (Shiina et al., 1993)	Apertura no selectiva de canales de Ca^{2+} y salida de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (Pepperell et al., 1999)	Sí
A23187 5 μM (- Ca^{2+} extracelular)	Único pico (Vincent et al., 1992)	Transporte de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares al citoplasma (Vincent et al., 1992)	No
A23187 5 μM (+ Ca^{2+} extracelular)	Único pico	Transporte de Ca^{2+} extracelular y de los reservorios intracelulares al citoplasma	Sí
2-APB 200 μM	Único pico (Carvacho et al., 2013)	Entrada de Ca^{2+} extracelular a través de TRPV3 (Lee et al., 2016)	Sí
Timerosal 50 μM	Oscilaciones (Swann, 1992)	Salida de Ca^{2+} del retículo endoplasmático por acción sobre IP_3R (Cheek et al., 1993; McGuinness et al., 1996)	No

Tabla 1.1 Exposición de PS en ovocitos de ratón luego del tratamiento con agentes activadores que movilizan el Ca^{2+} de manera diferencial.

Se ha descrito que las oscilaciones de calcio orquestan en forma diferencial los distintos eventos asociados a la activación (Ducibella et al., 2002). La exposición de PS en la membrana de ovocitos activados podría entonces depender de distintas variables asociadas al aumento de $[Ca^{2+}]_i$, tales como su distribución espacio-temporal (en forma de oscilaciones o de un único pico), la duración del aumento, la concentración máxima alcanzada y la fuente de donde proviene el calcio, incluyendo su pasaje a través de canales específicos. En primer lugar, se evaluó si la forma en la que sucedía el aumento de calcio era importante para el fenómeno estudiado. Por un lado, la exposición de PS se evidenció en ovocitos activados tanto con Sr^{2+} , que induce repetidas oscilaciones de calcio (Kline y Kline, 1992a), como con etanol o 2-APB, los cuales producen un único pico (Shiina et al., 1993; Carvacho et al., 2013). Por otro lado, a pesar de que fisiológicamente el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ ocurre en forma de oscilaciones gatilladas por el espermatozoide fertilizante, el tratamiento con timerosal, que también produce un patrón oscilatorio del calcio (Swann, 1992), no fue suficiente para inducir la exposición de PS. Por lo tanto, todos estos resultados sugieren que la distribución espacio-temporal de Ca^{2+} en el ovocito no sería determinante para el fenómeno de translocación. En este sentido, se ha propuesto que luego de la fertilización, más que la naturaleza oscilatoria del aumento del Ca^{2+} , sería la magnitud total de este aumento la necesaria para que ocurrieran los eventos de la activación ovocitaria (Ducibella et al., 2006; Ozil et al., 2006).

El tratamiento con A23187 en un medio libre de calcio desencadenó la activación partenogenética, con extrusión del segundo corpúsculo y exocitosis cortical, tal como se había reportado previamente (Vincent et al., 1992). Sin embargo, este activador no fue capaz de inducir la translocación de PS en el oolema. En estas condiciones, el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ sería producto únicamente de la salida del catión de los reservorios intracelulares (Vincent et al., 1992), debido a su ausencia en el medio de cultivo. Por lo tanto, era posible que el influjo de Ca^{2+} del medio extracelular fuera necesario para la translocación de PS. En este sentido, cuando el tratamiento con A23187 se realizó con agregado de Ca^{2+} al medio, lo que permitiría su entrada desde este compartimento, los ovocitos externalizaron PS en la membrana. Estos resultados apoyan la importancia de la entrada de calcio extracelular para la translocación de PS, así como ha sido propuesta para la correcta activación del ovocito (Miao et al., 2012).

Se ha descripto que, en el ovocito fertilizado, las oscilaciones de calcio son consecuencia no sólo de la liberación de calcio de reservorios intracelulares, sino también de la entrada de calcio extracelular que sería necesaria para el relleno de los mismos (Kline y Kline, 1992a; Shiina et al., 1993). En este sentido, la vía por la que ocurre el influjo de Ca^{2+} extracelular podría ser importante para la movilización de PS. Sin embargo, en las condiciones en las que se observó PS expuesta, el mecanismo de entrada de calcio variaba según el método de activación empleado (Tabla 1.1). Por un lado, el Ca^{2+} entraría a la célula a través de los canales $\text{Ca}_v3.2$ y/o TRPM7 luego de la fusión con el espermatozoide (Bernhardt et al., 2015, 2018) o de TRPV3 por tratamiento con Sr^{2+} o 2-APB (Carvacho et al., 2013; Lee et al., 2016). Por otra parte, el etanol generaría la apertura no selectiva de canales del oolema en forma transitoria (Pepperell et al., 1999), mientras que el ionóforo A23187 en presencia de Ca^{2+} extracelular transportaría el catión en forma pasiva a través de la membrana plasmática (Vincent et al., 1992). En conjunto, estas evidencias sugieren que, más que la forma en la que entra el catión a la célula, la entrada misma sería determinante para gatillar la exposición de PS. Sería posible entonces que la contribución del calcio extracelular junto con el proveniente de reservorios intracelulares proveyera el tono de calcio necesario para la activación de las escramblasas y la translocación de PS.

Una vez evaluado el rol del calcio, se estudió cómo las modificaciones del citoesqueleto de actina participan de la translocación de PS en el oolema. Se ha descripto que los filamentos de actina juegan un papel importante en distintos eventos de la activación ovocitaria (Sun y Schatten, 2006), incluyendo la exocitosis de GC y la emisión del segundo corpúsculo polar. Por otra parte, se reportó que la disrupción de los filamentos de actina por tratamiento con CytD inhibe la exposición de PS en células HEL (Kunzelmann-Marche et al., 2001) pero no en plaquetas (Gaffet et al., 1994). Por lo tanto, la polimerización/despolimerización del citoesqueleto podría afectar el proceso de translocación de fosfolípidos en ovocitos. En nuestro caso, la activación en presencia de CytD, a pesar de prevenir la extrusión del segundo corpúsculo polar, no inhibió la externalización de PS, indicando que la polimerización de actina no sería necesaria para este fenómeno en ovocitos. Es importante destacar que, en el reporte con células HEL, el tratamiento con CytD produjo también una disminución en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kunzelmann-Marche et al., 2001) pudiendo ser ésta la causa de la menor translocación de PS. Por otro lado, el

tratamiento con un inhibidor de la despolimerización de actina (Jas) previno la exocitosis de GC, tal como ya había sido descrito (Terada et al., 2000). Esto indica que la despolimerización sería necesaria para este fenómeno exocítico, apoyando que, al igual que en células secretoras, el citoesqueleto de actina formaría una barrera física que prevendría la exocitosis prematura de los GC en el ovocito (Sun y Schatten, 2006). Más aún, la incubación con Jas también inhibió la externalización de PS en el oolema. En este sentido, se ha descrito que PS interactúa con distintas proteínas de unión a actina (Muguruma et al., 1995; Makuch et al., 1997; Johnson et al., 1998b), y en particular a espectrina (Sikorski et al., 1987; Cohen et al., 1986), proteína crucial para la estabilidad y estructura de la membrana plasmática (Zhang et al., 2013). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el desensamblaje de una barrera formada por F-actina junto a otras proteínas del citoesqueleto sería un requisito para la translocación de PS en ovocitos de ratón.

Si bien la movilización de PS durante la activación/fertilización podría ser simplemente producto de la activación de las escramblasas, como una consecuencia colateral del aumento de $[Ca^{2+}]_i$, no puede descartarse que este fenómeno module eventos o vías de señalización importantes para las etapas tempranas del desarrollo. Una de las posibilidades era que, debido a su ocurrencia tan temprana luego de la fusión de las gametas o de la activación partenogenética, la presencia de PS en la cara externa de la bicapa contribuyera a los mecanismos de bloqueo de polispermia a nivel de la membrana plasmática. Este bloqueo podría ser producto de la interacción directa de la PS expuesta con la membrana de los espermatozoides, o por un cambio local en la densidad de carga en el oolema (la acumulación de PS externa produciría un aumento de carga negativa en la cara extracelular y positiva en la intracelular). No obstante, se ha descrito que en ratón la activación partenogenética con Sr^{2+} no previene la incorporación/fusión de otros espermatozoides (Gardner y Evans, 2006) y que la fertilización *in vitro* en presencia de CytD produce altas tasas de polispermia (McAvey et al., 2002), aun cuando en nuestro sistema ambos tratamientos provocaron la translocación del fosfolípido. Estas evidencias hacen poco probable un rol de PS en el bloqueo de la polispermia.

La presencia de PS en el compartimiento citoplasmático también podría servir como un anclaje molecular para proteínas que contienen el dominio C2 (Fairn y Grinstein, 2008; Yeung et al., 2009) y, de esta manera, la translocación podría modular la actividad de estas

proteínas a través de la regulación de su localización subcelular y su disponibilidad. En este sentido, varias proteínas que participarían de la activación ovocitaria contienen dominios C2, entre las que se encuentran PLC ζ y PKC (Kaibuchi et al., 1989; Johnson et al., 1998a; Kouchi et al., 2005). Mientras que PLC ζ es una proteína de origen espermático, en el ovocito existen varias isoformas de PKC que serían activadas y translocadas a la membrana plasmática luego de la fertilización (Halet, 2004; Baluch et al., 2004), y podrían ser reguladas por la localización de PS. Sin embargo, tal como se mencionó en la Introducción, los estudios con agentes farmacológicos que modulan la actividad de PKC presentaron resultados contradictorios y, por lo tanto, la función de esta quinasa durante la fertilización aún no ha sido completamente dilucidada. En este sentido, a través de experimentos no incluidos en esta Tesis, hemos abordado la evaluación de la funcionalidad de PKC durante la activación y su relación con la exposición de PS mediante el uso de PMA (miristato acetato de forbol, activador de PKC) y bisindolilmaloimida I (inhibidor de PKC). No obstante, nuestros resultados no fueron concluyentes, por lo que no continuamos explorando estos aspectos.

Tal como se mencionó en la Introducción, uno de los primeros eventos que ocurren durante la activación es la exocitosis de GC. La translocación de fosfolípidos podría ser entonces una consecuencia de los múltiples eventos de fusión que ocurren en la membrana del ovocito. Sin embargo, si bien A23187 y timerosal gatillaron la exocitosis cortical, no produjeron exposición de PS en el oolema (ver Tabla 1.1), descartando esta posibilidad. Distintas observaciones, no obstante, nos sugirieron una conexión en las vías de señalización que conllevan a la exposición de PS y a la exocitosis cortical: por un lado, no se observó exposición de PS en los tratamientos que prevenían la exocitosis cortical (incubación con TPEN o con Jas); por otro, en ovocitos activados con Sr^{2+} , la marcación para ANX5-FITC se detectó específicamente en los sitios de fusión de los GC. Estas evidencias nos permitieron especular con la existencia de una asociación funcional entre ambos eventos de membrana. En este sentido, recientemente se ha descrito una relación entre la movilización de PS y fenómenos de tráfico de membrana en otros tipos celulares (Ory et al., 2013; Rysavy et al., 2014). En particular, se ha observado que en células cromafines, luego de la exocitosis masiva de neurotransmisores, ocurre un mecanismo de EC en forma concomitante con la exposición de PS en la membrana, y que ambos eventos estarían

regulados por la escramblasa PLSCR1 (Ory et al., 2013). A partir de esto, conjeturamos que en ovocitos fertilizados de ratón, luego de la exocitosis cortical, podría ocurrir una EC como mecanismo homeostático de membrana para compensar el aumento exacerbado del área superficial, y que podría ser regulado por la movilización de PS. No obstante, si bien este tipo endocitosis había sido reportada en ovocitos de erizo de mar y *Xenopus* (Whalley et al., 1995; Bement et al., 2000), no había evidencias de su ocurrencia en mamíferos. A pesar de que sí han sido descriptos eventos endocíticos tempranos en ovocitos fertilizados de hámster mediante ensayos de internalización de un dextrano fluorescente (Kline y Stewart-Savage, 1994), no podría asegurarse que ese tipo de endocitosis correspondiera específicamente a EC. Más aún, en la membrana de ovocitos de hámster ocurren cambios de capacitancia durante la exo-endocitosis, no detectados en el ovocito murino (Igusa et al., 1983; Jaffe y Cross, 1984). Por lo tanto, para estudiar la asociación entre la exposición de PS luego de la fertilización y posibles fenómenos endocíticos, nos dispusimos a estudiar en primer lugar la existencia de la EC en ovocitos murinos.

El hecho de que el material exocitado de los GC en ratón sea específicamente detectado con la lectina LCA (Ducibella et al., 1988) nos permitió rastrear el movimiento de las membranas provenientes de los gránulos fusionados. Primeramente, caracterizamos la cinética de la exocitosis cortical en nuestro sistema experimental, lo cual era fundamental para los subsiguientes ensayos de endocitosis. Nuestros experimentos indicaron que la fusión de los gránulos con la membrana plasmática comenzaba prontamente luego de la exposición de ovocitos sin ZP a Sr^{2+} , detectándose exudado cortical en el oolema tras 15 minutos de estímulo. Tal como se mencionó previamente, la exocitosis de GC es gatillada por un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kline y Kline, 1992a). En este sentido, las mediciones fluorimétricas utilizando Fura-2 AM mostraron los primeros aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dentro de los 15 minutos de estímulo, reforzando la idea de que el material marcado con LCA es producto de la fusión de los GC dependiente de calcio.

A diferencia del reporte que medía incorporación de dextrano fluorescente en ovocitos fertilizados de hámster (Kline y Stewart-Savage, 1994), el diseño de un experimento de pulso y caza empleando LCA permitió analizar específicamente la existencia de un mecanismo de internalización de la membrana exocitada. Considerando que tanto en ovocitos de erizo de mar y *Xenopus* (Whalley et al., 1995; Bement et al., 2000),

como en otros sistemas celulares (Gundelfinger et al., 2003), la EC ocurre rápidamente luego de la exocitosis, se eligió el menor tiempo de estímulo con SrCl_2 que produjera un aumento significativo del exudado cortical en la membrana (es decir, 15 minutos), para evitar la pérdida de posibles eventos endocíticos tempranos. Luego del pulso con LCA, y tras 30 minutos de caza a 37°C , se detectó la internalización de la sonda fluorescente en el citoplasma del ovocito, que no era observada cuando la caza se realizaba a 4°C , temperatura no permisiva para eventos de tráfico de membrana (Chanaday y Kavalali, 2018). Este resultado nos indicó no sólo la existencia de un fenómeno endocítico en el ovocito, sino también que la técnica empleada sería adecuada para evaluar esta endocitosis en nuestras condiciones experimentales. Una limitación de nuestro método de detección, sin embargo, fue la posible subestimación del material endocitado. Dado que la endocitosis resulta de una invaginación de la membrana y el subsecuente desprendimiento de las vesículas endocíticas formadas hacia el citoplasma, no es posible discernir por microscopía confocal entre la marca correspondiente al exudado en la membrana plasmática y la presente en las nuevas vesículas formadas que aún no hubieran sido liberadas al citoplasma.

Dada la naturaleza novedosa de este evento que no había sido reportado en ovocitos de ratón, se procedió a su caracterización y al estudio de las vías moleculares que lo regulan. Reportes recientes sugieren la participación de calmodulina y calcineurina en la EC en otros tipos celulares, incluyendo ovocitos de erizo de mar (Igarashi y Watanabe, 2007; Covian-Nares et al., 2008; Wu et al., 2009, 2014b). Más aún, se ha descrito que la calcineurina, fosfatasa que actúa río abajo de la calmodulina, está presente en ovocitos porcinos y murinos, con roles en la exocitosis de GC (Tůmová et al., 2016) y en la maduración ovocitaria (Wang et al., 2017), respectivamente. En nuestro caso, el tratamiento con CsA, inhibidor de la calcineurina, produjo una disminución significativa en la cantidad de LCA internalizada, confirmando la participación de esta fosfatasa en esta endocitosis. Por otra parte, el tratamiento con Stp, que previene la EC en ovocitos de erizo de mar (Covian-Nares et al., 2008), también fue capaz de inhibir la internalización de la lectina en nuestro sistema, lo que refuerza que la endocitosis observada podría corresponder a un mecanismo de EC. Aunque el mecanismo involucrado en la inhibición por Stp no es claro debido al amplio espectro de acción de esta droga, es interesante

destacar que PKC, uno de los blancos de Stp, desempeña un papel clave en procesos endocíticos (por ejemplo, la endocitosis de canales K_{ATP} en células pancreáticas (Han et al., 2018)) además de sus posibles roles durante la activación ovocitaria, descritos en la Introducción. Si bien se ha propuesto que PKC podría regular la exocitosis de GC (Halet, 2004), Stp no afectó la exocitosis cortical en nuestro sistema experimental. Esto es similar a lo descrito en un artículo indicando que la inhibición de PKC en ovocitos murinos durante la fertilización no previene la liberación de GC (Ducibella y LeFevre, 1997). Sin embargo, la translocación de PKC al oolema durante la fertilización (Halet, 2004) podría ser necesaria para que ocurra la EC. Cabe destacar además que, en nuestros ensayos, el tratamiento tanto con CsA como con Stp resultó en una inhibición parcial de la internalización de LCA, lo que podría deberse a la existencia de varios mecanismos de regulación involucrados en la ocurrencia de esta endocitosis.

Se ha descrito que el citoesqueleto de actina participa en procesos de exo-endocitosis en distintos sistemas (Gundelfinger et al., 2003; Meunier y Gutiérrez, 2016; Hinze y Boucrot, 2018). Por ejemplo, se ha reportado que, en vesículas secretorias, una red de actina-espectrina formaría una barrera pasiva previniendo el acceso de estas vesículas a los sitios de fusión en la membrana plasmática, y que el desensamblaje local de estos filamentos sería necesario para su exocitosis (Valentijn et al., 1999; Trifaró et al., 2000). En nuestro caso, tal como se discutió previamente, la despolimerización de actina fue necesaria para gatillar la exocitosis de GC (ver Fig. 1.12). Por otro lado, la polimerización de la actina también jugaría un rol en distintas etapas del proceso endocítico incluyendo la fisión de las nuevas vesículas, su liberación de la membrana plasmática y su posterior transporte dentro del citoplasma (Qualmann et al., 2000; Qualmann y Kessels, 2002). En este sentido, nuestros resultados con inhibición total de la EC en presencia de disruptores de actina indican el requerimiento del citoesqueleto en este proceso endocítico.

Por otro lado, se ha propuesto que la membrana plasmática se encuentra compartimentalizada a través de distintos elementos que podrían organizar las maquinarias necesarias para el tráfico de membrana. Entre ellos, se encuentran los dominios tipo “*rafts*” o balsas lipídicas (Gundelfinger et al., 2003), los cuales contienen colesterol, que modularía la curvatura de la membrana durante los eventos de fusión (Ivankin et al., 2012). En este sentido, los componentes de las vesículas sinápticas que son

re-internalizadas en células neuronales se organizarían en “rafts” (Martin, 2000) y la depleción de colesterol reduciría esta endocitosis, tal como ocurre en células de glándula adrenal de rata (Thiele et al., 2000). A su vez, la membrana del ovocito murino es rica en balsas lipídicas, conteniendo estructuras tipo caveolas (Buschiazzo et al., 2013), y su disrupción por la depleción de colesterol afecta eventos posteriores a la fertilización, tales como la extrusión del segundo corpúsculo polar (Buschiazzo et al., 2013). En nuestro caso, sin embargo, el uso de Filipina, un compuesto de unión al colesterol que interrumpe los “rafts” lipídicos e inhibe la endocitosis a través de caveolas (Lamaze y Schmid, 1995; Orlandi y Fishman, 1998), no afectó la internalización de LCA, sugiriendo que estos dominios no serían importantes para la EC en ovocitos.

Se ha descrito que las vías endocíticas acopladas a exocitosis son dependientes del mecanismo por el cual ocurren dichos eventos exocíticos (Gundelfinger et al., 2003). Tal como se mencionó en la Introducción, se ha propuesto que la exocitosis cortical en ovocitos de diferentes especies sería consecuencia de un mecanismo caracterizado por el recubrimiento de las vesículas con F-actina, al cual denominaron “kiss-and-coat” (Sokac y Bement, 2006). En particular, en ovocitos de *Xenopus*, la G-actina se ensambla formando filamentos alrededor de los GC fusionados a la membrana (Sokac et al., 2003). Este recubrimiento no sólo estabilizaría la vesícula secretoria durante su unión con la membrana plasmática, sino que podría ser responsable de la EC posterior (Sokac et al., 2006). Si bien no hay evidencias respecto a un mecanismo tipo “kiss-and-coat” en ovocitos de mamíferos, el hecho de que el tratamiento con disruptores de actina como CytD y LatA previniera casi en su totalidad la internalización de LCA en nuestro sistema apoya la importancia de los filamentos en estos eventos endocíticos. La posibilidad de que la exocitosis cortical en ovocitos murinos sea producto de un mecanismo similar al “kiss-and-coat” se discutirá más adelante junto a otras evidencias obtenidas a lo largo de esta Tesis.

En sistemas donde se detecta exocitosis por fusión total, la endocitosis posterior puede requerir del recubrimiento por clatrina para la invaginación de las vesículas (Gundelfinger et al., 2003; Milosevic, 2018). Si bien clatrina ha sido detectada en ovocitos inmaduros de ratón, donde participaría de una endocitosis mediada por receptor a través de GRP3 (Lowther et al., 2011), en ovocitos MII esta proteína jugaría únicamente un rol en el ensamblaje del huso meiótico (Maro et al., 1985; Lu et al., 2017). En nuestro caso, la

inhibición de clatrina no produjo una reducción en la internalización de las vesículas con LCA, sugiriendo que la EC sería independiente de la acción de esta proteína.

En distintos tipos de endocitosis, la GTPasa dinamina es la encargada de la liberación de las vesículas invaginadas de la membrana plasmática a través de la formación de estructuras en forma de anillo (Stowell et al., 1999; Holroyd et al., 2002; Meunier y Gutiérrez, 2016). Asimismo, la dinamina sería capaz de promover el ensamblaje de actina alrededor de las vesículas fusionadas (Lee y De Camilli, 2002; Merrifield et al., 2002; Orth et al., 2002; Schafer, 2002). Nuestros experimentos con el inhibidor Dynasore pusieron en evidencia que la dinamina participaría en la internalización de LCA en ovocitos, tal como ocurre en otros sistemas celulares, incluyendo ovocitos inmaduros de ratón (Lowther et al., 2011). Se ha descrito además que esta GTPasa, que se encuentra fosforilada en el citoplasma, debe ser desfosforilada para cumplir su acción durante la endocitosis (Liu 1997). En particular, en terminales nerviosas, dinamina es rápidamente desfosforilada por la acción de calcineurina luego de un influjo de calcio (Liu 1994). Por lo tanto, la reducción en la internalización de LCA que observamos con el inhibidor de calcineurina (CsA) podría ser consecuencia de que la dinamina no estuviera correctamente desfosforilada para cumplir su función.

En conjunto, nuestros experimentos indican que la EC en ovocitos de ratón sería dependiente de la polimerización de actina y de la actividad de dinamina, e independiente de clatrina y los “rafts” lipídicos”. En concordancia con otros reportes, estos resultados serían consistentes con el mecanismo de endocitosis “kiss-and-coat” antes mencionado. Para confirmar esta posibilidad sería necesaria la realización de estudios adicionales para verificar que en ovocitos de ratón los gránulos fusionados a la membrana se recubren de F-actina, tal como ocurre en ovocitos de *Xenopus* (Sokac et al., 2003). Si bien en esta Tesis se realizó la co-tinción con Faloidina fluorescente y LCA para los ensayos descritos en la Figura 1.17, se requieren técnicas de microscopía de mayor resolución, tales como TIRF (microscopía de fluorescencia de reflexión interna total), para su evaluación al nivel microscópico necesario.

Tal como se ha descrito en otras células secretoras, el exceso de membrana incorporada al oolema debería ser internalizado por mecanismos de EC para asegurar la homeostasis luego de la exocitosis masiva de GC (Gundelfinger et al., 2003). Sin embargo,

luego de la caza, se detectó gran cantidad de exudado cortical en la membrana plasmática (ver Fig. 1.14), incluso después de 6 horas de caza (resultados no incluidos en esta Tesis). Más aún, la cantidad de marca internalizada fue mucho menor en comparación a la cantidad de GC que podrían haberse exocitado en ese tiempo. Si bien esto sugiere una incompleta recuperación del material exocitado, podría también ser consecuencia de la subestimación de la marca internalizada mencionada previamente. Por otro lado, es posible que el ovocito cuente con otros mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis de la membrana plasmática luego de la fertilización, tales como la liberación de exosomas al espacio perivitelino (Miyado et al., 2008; Bianchi et al., 2014).

La EC no sólo se observó en los ovocitos activados con Sr^{2+} , sino también en activados por la entrada de espermatozoides, es decir, en los fertilizados *in vitro*, lo que indica que este fenómeno ocurriría en forma fisiológica. Sin embargo, la relevancia funcional de este proceso endocítico aún es desconocida. Una posibilidad es que la EC sea relevante para el correcto desarrollo embrionario temprano. Se ha establecido que uno de los pasos para la citocinesis en células somáticas implica el reclutamiento de vesículas que contribuirían a aumentar la cantidad de membrana interna requerida para la división celular, y que provendrían exclusivamente de las vías de EC en esas células (Kettle et al., 2015). Si este fuera el caso también en los ovocitos, las vesículas endocitadas podrían proveer la acumulación de membrana para la primera división mitótica. Sin embargo, se ha reportado que los ovocitos activados partenogenéticamente en presencia de disruptores de actina (en los que observamos inhibición completa de EC) presentan solamente sutiles diferencias en el desarrollo preimplantatorio hasta la etapa de blastocisto respecto al control (Liu et al., 2002; Bianchi et al., 2010). Dado que en esos casos los inhibidores son agregados de forma transitoria, la falta de problemas en el desarrollo embrionario podría ser consecuencia de una EC tardía que compensara la inhibición inicial. Por otro lado, la EC podría tener una función más temprana en la incorporación de la cabeza espermática, que ocurriría completamente por un mecanismo endocítico (Florman y Fissore, 2015). Finalmente, tampoco puede descartarse la posibilidad de que la EC en el ovocito sea un mecanismo evolutivo remanente, como parte de la maquinaria exo-endocítica que existe en células secretoras especializadas.

Una vez caracterizado el fenómeno de EC en ovocitos murinos, nos propusimos evaluar si el mismo estaba asociado a la exposición de PS detectada luego de la fertilización/activación. Tal como se describió previamente, en células cromafines la EC estaría regulada por la escramblasa PLSCR1 y asociada a la exposición de PS en membrana (Ory et al., 2013). En este sentido, el transcripto de *Plscr1* se ha detectado en ovocitos murinos, pudiendo ser ésta la enzima responsable de la translocación de PS luego de la fertilización (Curia, 2011). Sin embargo, al igual que en células cromafines (Ory et al., 2013), los anticuerpos comerciales existentes para PLSCR1 no han permitido su detección en el ovocito murino. La microinyección de *Plscr1* acoplada a una sonda fluorescente en ovocitos tanto inmaduros como maduros nos permitió evaluar la localización de la proteína expresada, la cual se evidenció principalmente en la membrana, consistente con su actividad biológica. Para establecer la existencia de una asociación entre la exposición de PS y la EC, utilizamos la estrategia descrita en células cromafines, a través de la expresión de una forma dominante negativa de PLSCR1 (Mut), insensible al calcio y constitutivamente inactiva, la cual no inhibe la exocitosis de los neurotransmisores, pero sí la exposición de PS y la EC (Ory et al., 2013). Tal como se mencionó en Resultados, para estos ensayos las microinyecciones no pudieron ser realizadas sobre ovocitos inmaduros. Esto se debió a que los ovocitos en Profase I después de la maduración *in vitro* unían ANX5-FITC en forma constitutiva, por lo que no podrían ser utilizados para evaluar la translocación de PS luego de la activación. Más aún, se ha reportado que los ovocitos madurados *in vitro* no son completamente competentes para secretar el contenido de los GC (Liu et al., 2005; Cappa et al., 2018), por lo que tampoco habrían sido adecuados para los estudios de EC. Por todo ello, se realizó la microinyección de *Plscr1* sobre ovocitos MII y, luego de su activación con Sr^{2+} , se evaluó la exposición de PS, la cual esperábamos que estuviera inhibida en células expresando la proteína Mut. Sin embargo, en nuestro caso, los ovocitos activados que expresaban esta variante exponían PS en su membrana en igual magnitud que los controles no inyectados o los inyectados con la proteína WT. De esta manera, a través de la microinyección de PLSCR1 Mut, no fue posible obtener ovocitos incapaces de translocar PS en su membrana y, por lo tanto, no se pudo emplear esta estrategia para estudiar su asociación con la EC. La exposición de PS en presencia de PLSCR1 Mut podría deberse a una compensación funcional por otras proteínas con actividad escramblasa (Rysavy et al., 2014). En este sentido, en los últimos años, se describió que TMEM16F es responsable de

la exposición de PS dependiente de Ca^{2+} en plaquetas y resulta fundamental para la correcta coagulación sanguínea (Suzuki et al., 2010a). En concordancia con esto, detectamos la presencia del transcripto *Tmem16f* en el ovocito murino, por lo que la expresión de esta proteína podría contribuir a la translocación de PS durante la activación. Por otro lado, *Xkr8*, otra proteína cuya actividad escramblasa ha sido recientemente descrita, sería la responsable de translocar PS en células apoptóticas (Suzuki et al., 2013). Si bien no hemos evaluado la presencia del transcripto *Xrk8* en ovocitos, su participación durante la apoptosis, y no en la activación celular, hace poco probable un rol en la activación ovocitaria.

Debido a la imposibilidad de utilizar el abordaje experimental antes mencionado, debimos buscar estrategias indirectas para evaluar la asociación entre la exposición de PS y la EC. En este sentido, el ionóforo de calcio A23187 en ausencia de calcio extracelular ha demostrado una capacidad reducida para promover la exposición de PS en los ovocitos, a pesar de inducir normalmente la exocitosis cortical (ver Fig. 1.7). En este contexto, vimos que los ovocitos tratados con ionóforo tenían afectada la EC, apoyando la idea de una asociación funcional entre la movilización de PS y esta endocitosis. Asimismo, nuestros resultados demuestran que, más allá del fino acoplamiento que existe entre endocitosis y exocitosis, estos procesos pueden ser disociados en ovocitos. Resultados en otros sistemas celulares avalan la participación de diferentes especies de lípidos en la EC (Gundelfinger et al., 2003) y, en particular, la exposición de PS podría contribuir al acoplamiento exo-endocítico en ovocitos murinos por los motivos descritos a continuación. En primer lugar, a través de su unión a dominios C2 (Fairn y Grinstein, 2008; Yeung et al., 2009) o por interacciones electrostáticas, PS podría regular el reclutamiento de diferentes factores involucrados en la modulación del proceso exo-endocítico como, por ejemplo, sinaptotagmina, MARCKS, Rab, Rac1, entre otros (Rysavy et al., 2014; Pérez-Lara et al., 2016). En particular, la sinaptotagmina, cuya expresión ha sido reportada en ovocitos murinos (Zhu et al., 2012), es un posible modulador de los procesos exo-endocíticos y actúa como un importante sensor de calcio para la exocitosis en varios sistemas celulares, incluyendo al ovocito de erizo de mar (Leguia et al., 2006). Además, es importante destacar que las proteínas de la familia MARCKS, que son fosforiladas y desfosforiladas por PKC y calcineurina, respectivamente, han sido asociadas a los procesos exo-endocíticos a través

de su translocación cíclica de la membrana plasmática al citoplasma (Liu, 1997). En este sentido, las MARCKS han sido detectadas en ovocitos murinos (Michaut et al., 2005) y modularían la exocitosis cortical en ovocitos de rata (Tsaadon et al., 2008). En segundo lugar, se ha propuesto que PS podría tener un rol en la adquisición de la curvatura de la membrana necesaria para la formación de vesículas, y su translocación entre ambas caras de la bicapa lipídica podría contribuir a fenómenos de tráfico de membrana (Rysavy et al., 2014). Finalmente, la exposición de PS podría participar de un mecanismo exo-endocítico tipo “*kiss-and-coat*”. Durante este mecanismo en ovocitos de *Xenopus*, el ensamblaje de F-actina ocurre rápidamente alrededor de los GC que se han fusionado con la membrana, pero no en los no fusionados (Sokac et al., 2003), indicando que no es el aumento de calcio intracelular quien promueve el recubrimiento de F-actina en estos casos sino la misma fusión de cada gránulo. Si bien no se conoce específicamente cómo se regularía el ensamblaje de actina en este mecanismo, se ha propuesto la participación de lípidos de membrana como mediadores para este proceso (Sokac y Bement, 2006). Por lo tanto, la movilización de PS que observamos específicamente en los sitios de fusión en el oolema podría estar involucrada en las vías que gatillan el recubrimiento de F-actina en estos gránulos para su posterior endocitosis. Más aún, dado que en otros sistemas el mecanismo por el cual ocurre la exocitosis es muy dependiente del tipo de estímulo de calcio (Cárdenas y Marengo, 2016), es posible que el tratamiento con A23187 en ovocitos indujera la exocitosis por otro mecanismo (como podría ser la fusión total), lo que justificaría la ausencia tanto de PS expuesta como de la posterior EC.

Tal como se mencionó en la Introducción, la principal causa de falla de fertilización en ciclos de ICSI se debe a defectos en la activación del ovocito (Flaherty et al., 1998; Rawe et al., 2000; Mahutte y Arici, 2003; Vanden Meerschaut et al., 2013, 2014). Si bien las técnicas de activación artificial del ovocito muchas veces han resultado apropiadas para solucionar estos defectos (Heindryckx et al., 2005, 2008; Montag et al., 2012), estos tratamientos son de carácter experimental. Entre los métodos existentes para promover el desarrollo meiótico, el procedimiento más utilizado en la práctica clínica es la activación química y, en particular, los ionóforos de calcio, resultando en tasas de fertilización de 25-48% y de nacimientos vivos del 28% (Ebner et al., 2015). Es importante destacar, sin embargo, que estos agentes químicos eluden los mecanismos endógenos de regulación del

calcio en el ovocito. En este sentido, los resultados de esta Tesis, junto con reportes anteriores, manifiestan evidentes diferencias entre los ovocitos fertilizados y los activados por ionóforo A23187. Además de que el tratamiento con A23187 produce un único pico de calcio (Vincent et al., 1992) y no induce la translocación de PKC α a la membrana plasmática en ovocitos de rata, a diferencia de lo que ocurre durante la fertilización (Eliyahu y Shalgi, 2002), los efectos descritos en esta Tesis ponen en evidencia alteraciones en la movilización de PS y una ausencia de EC. Sin embargo, no se puede descartar que los ovocitos humanos cuenten con maquinarias de regulación del calcio diferentes a las del ratón (evidenciado, por ejemplo, por su falta de respuesta a Sr^{2+} (Versieren et al., 2010)), o que los defectos aquí descritos sean compensados por la presencia de calcio en los medios de cultivo utilizados en la clínica. Habiendo hecho estas consideraciones, las diferencias aquí descritas para la activación con A23187 respecto a la fertilización en roedores, así como la falta de estudios epidemiológicos en cuanto a la práctica clínica debido a la escasa cantidad total de niños nacidos por estas técnicas, hacen imperioso un uso limitado y precavido de este reactivo para el tratamiento de la infertilidad humana.

En resumen, los resultados de este Capítulo indican que durante la activación ovocitaria ocurriría la translocación de PS en la membrana plasmática como consecuencia del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, del influjo de calcio del medio extracelular y de la remodelación del citoesqueleto de actina. Asimismo, la exocitosis masiva de GC iría acompañada de un mecanismo de EC, con participación de la calcineurina, quinasas no identificadas (inhibibles por Stp) y la dinamina, así como también los filamentos de actina. Finalmente, este mecanismo endocítico podría estar precedido y regulado por la translocación de PS. En la Figura 1.31 se resumen los resultados de este Capítulo junto con los posibles mediadores que actuarían en los eventos estudiados.

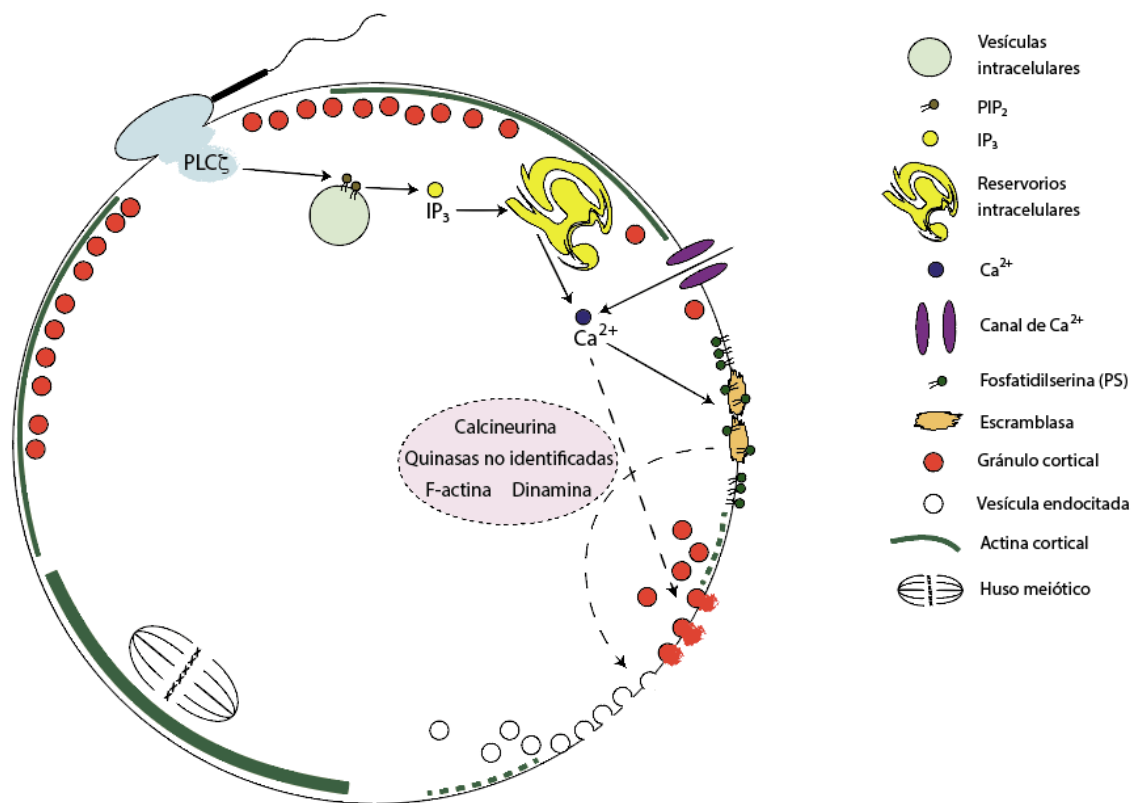


Figura 1.31 Representación de los Resultados del Capítulo I. La entrada del espermatozoide fertilizante libera PLCζ la cual produce IP₃ a partir de la hidrólisis de PIP₂ presente en vesículas intracelulares. El aumento de Ca²⁺ intracelular, producto de la acción de IP₃ sobre sus receptores en los reservorios intracelulares y el influjo del medio extracelular, junto con la despolimerización de la actina cortical inducen la translocación de PS hacia la cara externa de la bicapa mediada por escramblasas y la exocitosis de GC. A continuación, ocurre un mecanismo de EC para la recuperación de la membrana exocitada que estaría regulado por calcineurina, quinasas no identificadas, F-actina, dinamina, y la translocación de PS.

Capítulo II

**Estudio de los efectos del anticonceptivo de emergencia acetato de
ulipristal sobre los eventos post-ovulatorios del proceso reproductivo**

INTRODUCCIÓN

Acetato de ulipristal (UPA)

El acetato de ulipristal (17 α -acetoxi-11 β -[4-N,N-dimetilaminofenil-19-norpregna-4,9-dieno-3, 20-diona; UPA por sus siglas en inglés, y previamente conocido como CDB-2914) es un derivado de la 19-norprogesterona (Fig 2.1) y actúa como modulador selectivo del receptor de progesterona.

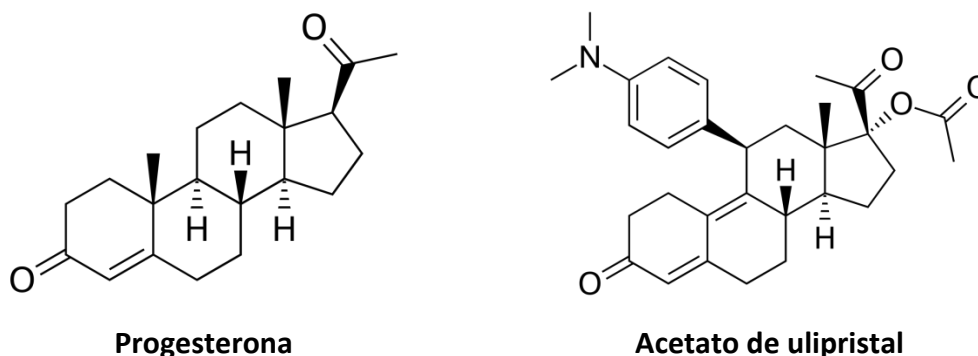


Fig 2.1 Estructura química de la progesterona y el acetato de ulipristal.

En los últimos diez años, UPA ha sido introducido como anticonceptivo de emergencia (AE) en el mercado de Europa, Estados Unidos, Canadá y Australia bajo marcas como EllaOne® (HRA Pharma). Actualmente su uso se extiende a más de 50 países y se lo recomienda como tratamiento hormonal de primera línea para anticoncepción de emergencia debido a su mayor efectividad y similar tasa de efectos secundarios en comparación con el levonorgestrel (LNG) (Gemzell-Danielsson et al., 2014; Rosato et al., 2015). Si bien en Argentina aún no está aprobada como AE, se autoriza el uso de menores dosis para el tratamiento de miomas uterinos (Levens et al., 2008).

La molécula de UPA se une con alta afinidad a ambas isoformas de los receptores de progesterona PR-A y PR-B, exhibiendo propiedades agonistas y antagonistas (Blithe et al., 2003; Chabbert-Buffet et al., 2005; Gemzell-Danielsson y Meng, 2010). Es importante destacar que a través de estos receptores intracelulares con actividad transcripcional es que la progesterona ejerce su acción sobre las funciones reproductivas normales de la mujer, desde la ovulación hasta la provisión de un ambiente uterino apropiado para el mantenimiento del embarazo (Niswender et al., 2000; Wira et al., 2015). Por otro lado, UPA

presenta menor afinidad de unión al receptor de glucocorticoides o andrógenos respecto a otros antiprogestágenos como la mifepristona (Gemzell-Danielsson y Meng, 2010).

Estudios farmacocinéticos indicaron que, luego de la ingesta de la píldora de 30 mg, UPA se absorbe rápidamente, alcanzando concentraciones máximas de 176 ± 89 ng/ml en las primeras 2 horas, con una vida media de 32.4 ± 6.3 horas (Snow et al., 2011). Esta droga se distribuye unida a proteínas plasmáticas, como albúmina, HDL y LDL. Su metabolización sería principalmente a través del citocromo P450 y su metabolito mono-desmetilado es farmacológicamente activo (Snow et al., 2011).

Efectividad de UPA

A través de diversos ensayos clínicos se evaluó la efectividad de UPA como AE, y en particular se la comparó con el ya utilizado LNG. Un ensayo de Fase III incluyendo 2221 mujeres demostró que UPA era más efectivo que LNG, incluso hasta 120 horas (5 días) después de ocurrida la relación sexual (Glasier et al., 2010), sin considerar el momento del ciclo en que se encontraba la participante del ensayo. En otro estudio en el que se evaluó específicamente su efectividad entre 48 y 120 horas posteriores a la relación sexual, se observó que la tasa de embarazo luego de la ingesta era solamente del 2.1%, siendo la tasa esperada sin protección del 5.5% (Fine et al., 2010). Más aún, cuando la toma de la pastilla ocurrió entre las 96 y 120 horas, sólo un 1.3% de mujeres resultaron embarazadas (Fine et al., 2010), confirmando que la ventana en la cual era efectiva podía extenderse hasta 5 días respecto a los 3 días recomendados para LNG. Si bien al día de hoy UPA resulta ser la opción oral más efectiva como AE, aún se realizan estudios clínicos con la misma ya que su mecanismo de acción aún no ha sido completamente esclarecido.

Mecanismo de acción de UPA

Efectos de UPA sobre la ovulación

Los diversos estudios clínicos realizados con la droga han puesto en evidencia que UPA presenta un efecto inhibitorio sobre la ovulación al ser administrado durante la fase folicular. En particular, durante la fase folicular media, con folículos entre 14 y 16 mm de

diámetro, una única dosis entre 10 y 100 mg produjo un retraso en la ruptura folicular y la supresión de los niveles plasmáticos de estradiol (Stratton et al., 2000). Por otro lado, cuando mujeres con folículos de diámetro mayor a 18 mm tomaron la píldora, ocurrió un retraso en la ruptura folicular de entre 5 y 6 días en el 59% de los casos (Brache et al., 2010). En particular, el bloqueo o retraso en la ovulación se observó en el 100% de las mujeres que al momento de la administración contaban con bajos niveles de LH, y en el 79% de las que tenían niveles crecientes de esta hormona. En estos casos, la ingesta de UPA suprimía el aumento de LH y la aparición del pico. Sin embargo, una vez que los niveles de LH habían alcanzado valores máximos al momento de la administración, las mujeres ovulaban normalmente.

A diferencia de LNG cuyos efectos antiovulatorios están restringidos a la fase folicular previo al aumento en los niveles de LH, UPA inhibe la ruptura folicular incluso si es administrado durante el aumento de LH (Brache et al., 2013). Hasta el momento, a partir de esta diferencia se justifica la mayor efectividad de UPA respecto a LNG, cuya ventana de acción se limita a 72 horas (3 días) posteriores a ocurrida la relación sexual. Sin embargo, dado que dentro de las 120 horas que la mujer tiene para tomar la píldora podría haber ocurrido el pico de LH, el efecto antiovulatorio no parecería ser suficiente para justificar la alta efectividad descrita para UPA.

Cabe destacar que el uso del modelo murino ha permitido profundizar en los mecanismos moleculares por los cuales UPA bloquearía la ruptura folicular. En ratones, la administración de la droga por vía i.p. junto con la hormona hCG (imitando el pico de LH) previene la ovulación (Palanisamy et al., 2006), constituyendo un buen modelo pre-clínico para el estudio de UPA. En este sentido, estudios posteriores en este modelo demostraron que el efecto antiovulatorio observado era consecuencia de una represión en la expresión de genes críticos para la ovulación, dependientes del receptor de progesterona (Nallasamy et al., 2013).

Efectos de UPA sobre la funcionalidad oviductal

El oviducto juega un rol fundamental en el proceso reproductivo, siendo el sitio en donde ocurre la interacción de gametas y el desarrollo del embrión resultante. Además, el

transporte del embrión al sitio de implantación en el útero sería consecuencia de las contracciones musculares y la actividad ciliar en el oviducto (Lyons et al., 2006), reguladas por la progesterona y sus receptores (Mahmood et al., 1998; Lyons et al., 2006; Wanggren et al., 2008; Bylander et al., 2010, 2013, 2015).

Un estudio ha reportado que la dosis farmacológica de UPA inhibe el batido ciliar y la contracción muscular de trompas de Falopio *in vitro* (Li et al., 2014). De esta forma, el efecto de este AE sobre la fisiología oviductal podría constituir un mecanismo adicional de prevención del embarazo, ya que podría alterar el transporte e interacción de gametas o producir una desincronización entre el blastocisto resultante y el endometrio para su correcta implantación.

Efectos de UPA sobre la funcionalidad espermática

En su tránsito por el tracto reproductor femenino, y luego de la ovulación, los espermatozoides están expuestos a niveles crecientes de progesterona secretados por las células de cúmulus y el cuerpo lúteo. En este sentido, la progesterona facilita la interacción de gametas en el tracto genital femenino en diversas especies animales (Libersky y Boatman, 1995; Holt y Fazeli, 2010), a través de la regulación de procesos asociados a la capacitación espermática. Esta hormona es capaz de inducir en los espermatozoides la entrada de calcio extracelular (Blackmore et al., 1990, 1991; Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), la fosforilación de proteínas en residuos tirosina (Chung et al., 2014) y otras cascadas de señalización que terminan en la ocurrencia de la reacción acrosomal, la hiperactivación y la quimiotaxis (Uhler et al., 1992; Teves et al., 2006; Baldi et al., 2009; Sagare-Patil et al., 2012). Al día de hoy no se ha dilucidado la identidad de la proteína o complejo proteico que frente al estímulo de la progesterona lleve a la ocurrencia de estos fenómenos. No obstante, considerando que los espermatozoides son células transcripcionalmente inactivas, estos efectos podrían estar mediados por receptores de membrana no genómicos. Por lo tanto, independientemente de la identidad de los receptores de progesterona en el espermatozoide, UPA podría ejercer acción agonista o antagonista sobre los mismos afectando la funcionalidad espermática.

Estudios *in vitro* sobre espermatozoides humanos mostraron que las concentraciones farmacológicas circulantes de UPA (10-1000 ng/ml) no afectarían parámetros funcionales tales como la viabilidad, la fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación y la reacción acrosomal espontánea o inducida por fluido folicular humano (Munuce et al., 2012). Estos resultados, por lo tanto, no indicaban una acción antagonista directa sobre el receptor de progesterona en el espermatozoide humano a las concentraciones evaluadas. Además, se observó que UPA protegería la integridad del ADN espermático, posiblemente a través de un efecto antioxidante de la droga (Munuce et al., 2013). En un estudio posterior, por otro lado, se reportó que UPA prevenía en forma dosis-dependiente la reacción acrosomal, la hiperactivación y el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por progesterona (Ko et al., 2014). Más aún, en presencia de un gradiente de progesterona, UPA exhibió un comportamiento quimio-repelente del espermatozoide (Guidobaldi et al., 2017). Si bien este efecto se manifestó únicamente a muy bajas concentraciones (0.1-1 ng/ml), la evidencia de que UPA podría afectar directamente al espermatozoide abre la posibilidad de que su capacidad fertilizante se encontrara comprometida en presencia de este AE.

Por otra parte, es importante destacar que, a diferencia de LNG que produciría un incremento en la viscosidad del moco cervical, perjudicando el tránsito de espermatozoides a la cavidad uterina (Kessuru et al., 1975; Spona et al., 1975), la administración de UPA no alteraría este parámetro (Jesam et al., 2016).

Efectos de UPA sobre la fisiología uterina y la implantación

Mientras que la acción de UPA sobre la ovulación es completamente reconocida, ha surgido controversia alrededor del hecho de que este AE pudiera actuar sobre la receptividad uterina. En contraposición, el efecto de LNG sobre la implantación ha sido ampliamente descartado (Lalitkumar et al., 2007; Meng et al., 2009; Palomino et al., 2010).

Como se mencionó previamente, UPA es capaz de modular la actividad de los receptores genómicos de progesterona PR-A y PR-B, los cuales se expresan tanto en el epitelio como en el estroma uterino (Mote et al., 1999; Patel et al., 2015). En la fase proliferativa, ambas isoformas están presentes en ambos compartimientos, a pesar de que

PR-A se encuentra en mayor proporción. Luego de la ovulación, los niveles de ambas decaen en el epitelio glandular, pero persisten en el estroma (Mangal et al., 1997; Garcia et al., 1988; Lessey et al., 1988; Mote et al., 1999). En particular, se ha visto que la función de PR-A es fundamental para la función endometrial a través del estudio de ratones mutantes: su falta produce en las hembras una implantación y decidualización completamente alteradas, además de la incapacidad de ovular normalmente (Mulac-Jericevic et al., 2000). Considerando estas evidencias y que UPA podría actuar sobre estos receptores, sería posible pensar que también modulara la fisiología uterina.

Los efectos de una única dosis de UPA sobre la funcionalidad uterina han sido poco estudiados en mujeres. En particular, la ingesta de una píldora de 50 mg de UPA durante la fase folicular media produjo un retraso en la maduración endometrial (Stratton et al., 2000) mientras que en la fase lútea temprana resultó en una disminución dosis-dependiente del espesor del endometrio (Stratton et al., 2010). Si bien algunos autores afirman que esta dosis no sería relevante para AE (Gemzell-Danielsson et al., 2014), otros indican que, en realidad, la formulación micronizada de 30mg de UPA (tal como se encuentra actualmente en el mercado) sería farmacocinéticamente equivalente a la utilizada en los trabajos de Stratton y colaboradores (Mozzanega et al., 2013). Por otra parte, el uso prolongado de bajas dosis de UPA (5 mg/día durante 9-13 semanas) para el tratamiento de miomas ha dado lugar a numerosos estudios sobre los efectos de UPA sobre la fisiología uterina (Williams et al., 2012; De Milliano et al., 2017; Whitaker et al., 2017; Nogales et al., 2018). Estos tratamientos producirían alteraciones histológicas compatibles con los “cambios endometriales asociados a moduladores del receptor de progesterona” (conocidos como PAEC, por sus siglas en inglés). En particular, la administración de UPA ha sido asociada con bajos niveles de proliferación glandular y estromal. Sin embargo, aún no ha sido esclarecido si los efectos reportados sobre la fisiología uterina podrían contribuir a la acción anticonceptiva de UPA, generando gran controversia entre distintos especialistas en el tema.

Los efectos de UPA sobre el proceso de implantación han sido menos estudiados debido a las lógicas imposibilidades éticas. Mediante un abordaje *in vitro*, se evaluó su efecto sobre la interacción de embriones humanos con constructos tridimensionales de endometrio (Berger et al., 2015). En este trabajo, no se evidenciaron cambios en la

adhesión de los embriones a los constructos respecto a los controles, ni en los niveles de genes asociados al proceso de implantación, sugiriendo que UPA no afectaría la implantación. No obstante, tal como se mencionó, esta es una aproximación *in vitro* que no emula completamente el proceso de implantación *in vivo*.

HIPÓTESIS

Considerando que UPA presenta una alta efectividad incluso hasta 120 horas luego de ocurrida la relación sexual y que la toma de la píldora podría ocurrir en cualquier momento del ciclo, nuestra hipótesis es que UPA presenta actividad anticonceptiva luego del pico de LH por mecanismos adicionales al del bloqueo de la ovulación.

OBJETIVO ESPECÍFICO

En función de la hipótesis planteada, el objetivo de este capítulo fue estudiar posibles efectos de UPA sobre el transporte e interacción de las gametas, el desarrollo embrionario y la implantación, a través de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando los modelos humano y murino.

RESULTADOS

Tal como se mencionó en la Introducción, UPA podría presentar efectos deletéreos sobre el proceso de fertilización como mecanismo adicional para su actividad anticonceptiva. Por lo tanto, en una primera instancia, se evaluó si esta droga era capaz de interferir con la capacidad de los espermatozoides humanos de interactuar con la gameta femenina y sus envolturas. No obstante, debido a las conocidas limitaciones éticas, los ovocitos empleados no provinieron de humanos, sino de roedores, para la realización de dos ensayos heterólogos ya validados (OMS, 2010; Battistone et al., 2014).

Considerando que las células del cúmulus que rodean al ovocito secretan progesterona (Baldi et al., 2009), se analizó la posibilidad de que UPA modulara el proceso de penetración del cúmulus. Para ello se estudió la capacidad de los espermatozoides humanos de penetrar el *cumulus oophorus* de ovocitos murinos en presencia de UPA (1000 ng/ml), agregado durante la capacitación espermática y/o la co-incubación de las gametas. La concentración de UPA elegida correspondió a una superior a la máxima encontrada en plasma luego de la ingesta de la píldora (176 ± 89 ng/ml, Snow et al., 2011). Luego de 15 minutos de co-incubación de las gametas, observamos que la cantidad promedio de espermatozoides por COC en las condiciones experimentadas no era significativamente diferente al control sin UPA (Fig. 2.2), indicando que a esta concentración la droga no alteraba la capacidad de los espermatozoides humanos de penetrar esta envoltura.

Por otro lado, se evaluó si UPA podía afectar la capacidad fusogénica del espermatozoide humano mediante el ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin ZP (HOPT, *hamster oocyte penetration test*). Para ello, los espermatozoides humanos fueron capacitados en presencia o ausencia de UPA (1000 ng/ml) y co-incubados con los ovocitos de hámster durante 2.5 horas. El agregado de UPA tanto en la capacitación como en la co-incubación de las gametas no produjo cambios significativos respecto al control en el porcentaje de ovocitos penetrados (Fig. 2.3.a) ni en el número de espermatozoides fusionados por ovocito (Fig. 2.3.b). Esto sugiere que, aún en presencia de UPA, los espermatozoides humanos fueron capaces de sufrir la reacción acrosomal, fusionarse con el oolema y descondensar su cabeza en el citoplasma del ovocito.

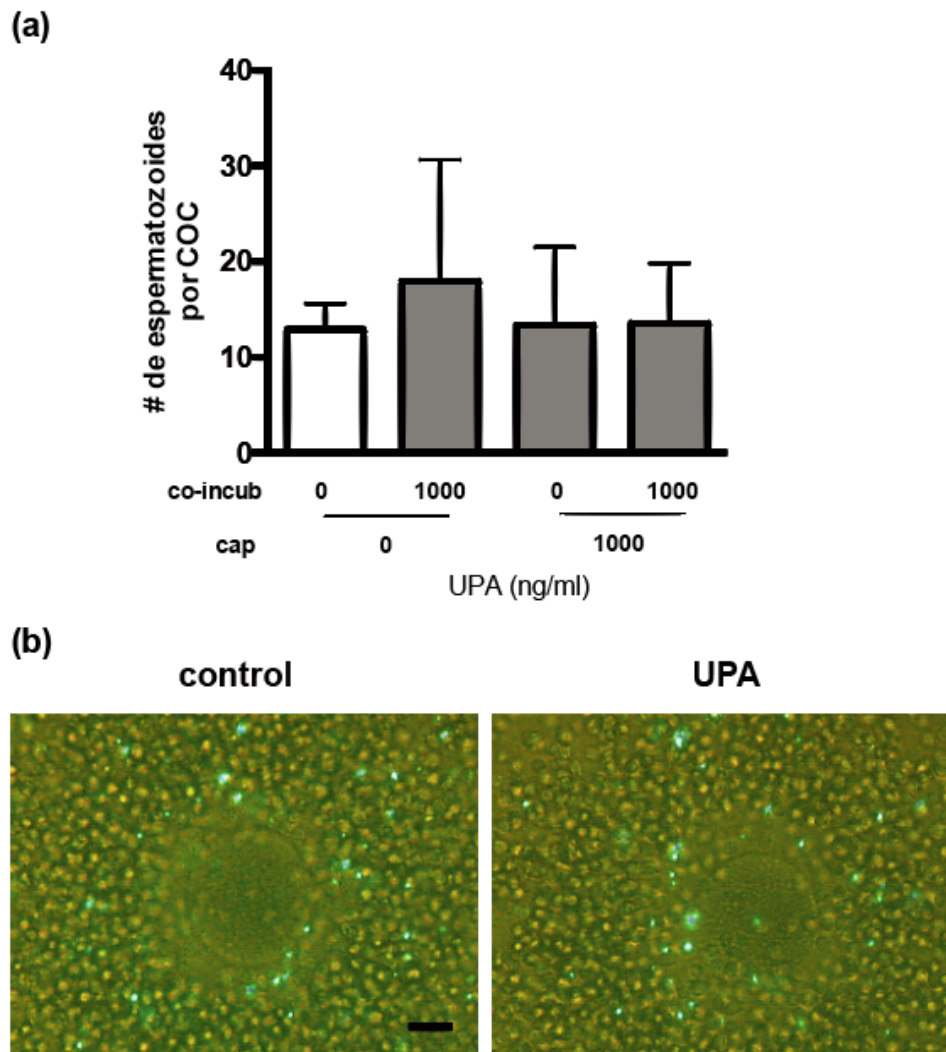


Figura 2.2 Efecto de UPA sobre la capacidad del espermatozoide humano de penetrar el *cumulus oophorus*. (a) Espermatozoides humanos fueron incubados en condiciones capacitantes (cap) durante 18 horas, expuestos a Hoechst y co-incubados (co-incub) con COCs de ratón por 15 minutos. La capacitación y la co-incubación fueron realizadas en presencia (1000 ng/ml) o ausencia de UPA. Se determinó el número de espermatozoides fluorescentes dentro del *cumulus oophorus*. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=4$, n.s. (b) Micrografías correspondientes a imágenes de campo claro combinadas con fluorescencia de COCs inseminados con espermatozoides control (izquierda) o tratados todo el tiempo con UPA (derecha). Notar la presencia de los espermatozoides fluorescentes dentro de cada COC. Barra: 25 μ m.

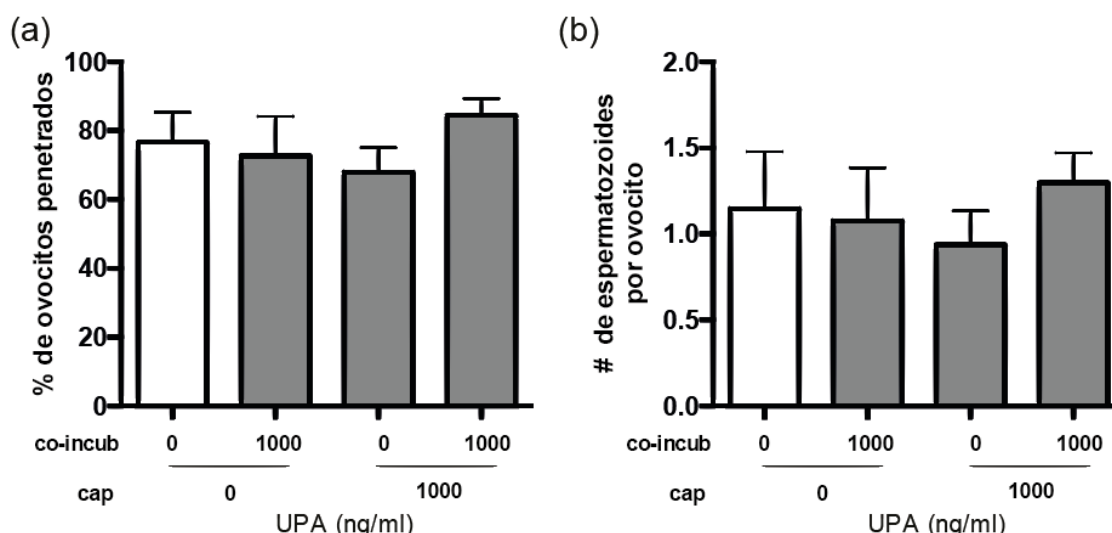


Figura 2.3 Efecto de UPA sobre la capacidad de espermatozoides humanos de penetrar ovocitos de hámster sin ZP. Espermatozoides humanos fueron incubados en condiciones capacitantes (cap) durante 18 horas y co-incubados (co-incub) con ovocitos de hámster sin ZP por 2.5 horas. La capacitación y la co-incubación fueron realizadas en presencia (1000 ng/ml) o ausencia de UPA. Se determinó el porcentaje de ovocitos que presentaban cabezas descondensadas de espermatozoides o pronúcleos y colas de espermatozoides en el ooplasma (a), y el número promedio de espermatozoides fusionados por ovocito (b). Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=3$, n.s.

En conjunto, los resultados con espermatozoides humanos sugieren una falta de efecto de UPA sobre la interacción de gametas *in vitro*. No obstante, considerando la complejidad del proceso de fertilización en mamíferos y que los experimentos descriptos se restringieron a un sistema *in vitro* empleando gametas heterólogas, la información obtenida de los mismos fue limitada. Frente a la imposibilidad de profundizar los estudios con humanos, se recurrió a la búsqueda de un modelo animal que permitiera el diseño de experimentos *in vivo*. El modelo escogido fue el ratón dado que, además de las múltiples ventajas que presenta como animal de experimentación, responde a la administración de UPA en forma similar al humano, es decir, con una inhibición de la ovulación (Palanisamy et al., 2006; Nallasamy et al., 2013). Por lo tanto, el ratón resultó un posible modelo pre-clínico para evaluar los efectos de este anticonceptivo sobre la fisiología reproductiva. De esta forma, los resultados obtenidos a través del uso de este modelo podrían ser útiles para estudiar aspectos que no pueden ser abordados en el humano.

Previo a la realización de estudios *in vivo*, se realizaron ensayos *in vitro* en los que la capacidad fertilizante del espermatozoide murino fue evaluada en presencia de UPA de forma de evaluar si su comportamiento era similar al observado con espermatozoides

humanos. En este caso, los experimentos de interacción de gametas se realizaron con gametas homólogas, lo que constituye una ventaja adicional del uso del ratón ya que incluye la evaluación de las etapas que confieren especie-especificidad. Los espermatozoides fueron entonces capacitados en presencia de diferentes concentraciones de UPA (0-1000 ng/ml) y usados para inseminar COCs murinos en presencia o ausencia de la droga durante la co-incubación de las gametas. En primer lugar, se observó que la viabilidad espermática al final de la capacitación ante la máxima concentración de UPA (1000 ng/ml) no presentó diferencias respecto al control (UPA $55.3 \pm 2.6\%$ vs control $47.0 \pm 1.2\%$, $n=3$, n.s.), indicando que la droga no ejercía un efecto tóxico sobre los espermatozoides murinos durante la capacitación. Los resultados revelaron que la tasa de fertilización, medida como el porcentaje de embriones en estadio de 2 células, no presentaba diferencias significativas en ninguna de las concentraciones y condiciones evaluadas en comparación al control (Fig. 2.4.a). Sabiendo que la presencia del *cumulus oophorus* ejerce un efecto beneficioso sobre el proceso de fertilización (Yanagimachi, 1994), se analizó también la capacidad de los espermatozoides tratados con UPA de penetrar ovocitos carentes de cúmulus. En este caso, cuando la máxima concentración empleada de UPA (1000 ng/ml) se agregaba al medio de capacitación y/o co-incubación de gametas, no se evidenciaron diferencias significativas entre los porcentajes de fertilización (Fig. 2.4.b). En conjunto, estos resultados indican que, al igual que lo observado en humano, la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides murinos no sería perjudicada por UPA.

Si bien la capacidad fertilizante de los espermatozoides no parecía estar afectada por la presencia de UPA, los parámetros espermáticos asociados a la capacitación podrían estar sutilmente alterados por la droga. Como uno de los eventos característicos de la capacitación, se evaluó la ocurrencia de la reacción acrosomal espontánea o inducida por progesterona en presencia o ausencia de UPA. Los ensayos realizados revelaron que la presencia de UPA (0-1000 ng/ml) durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides de ratón no afectó los porcentajes de reacción acrosomal, tanto espontánea como inducida, en ninguna de las concentraciones de UPA testeadas (Fig. 2.5). Este resultado está en concordancia con la falta de efecto de UPA sobre la reacción acrosomal en espermatozoides humanos, tal como se describió previamente (Munuce et al., 2012).

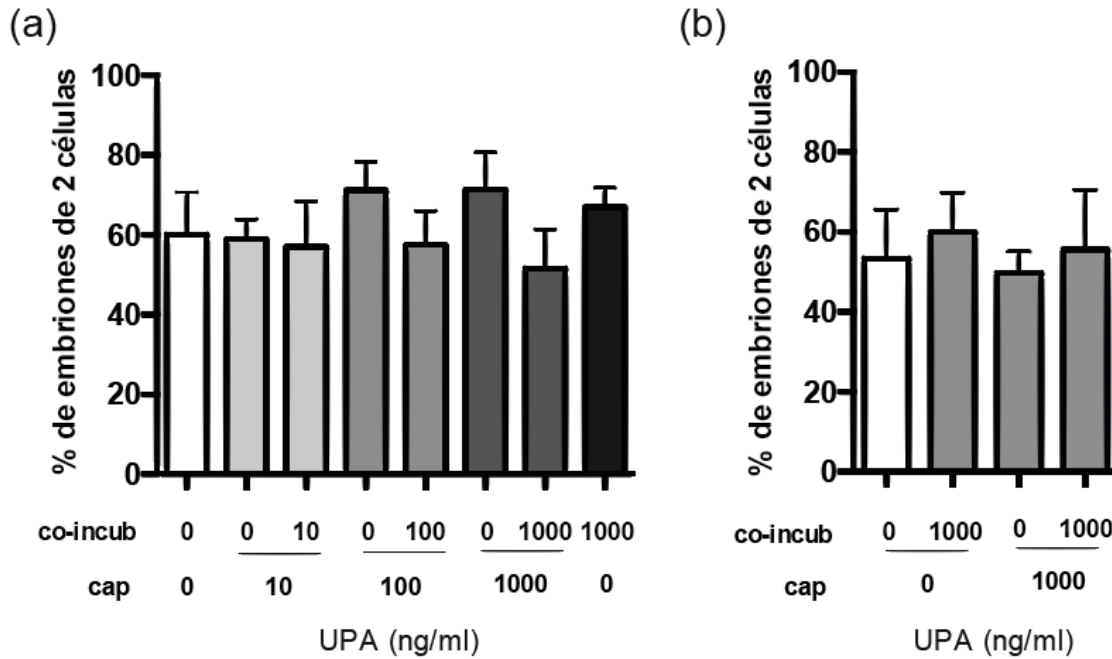


Figura 2.4 Efecto de UPA sobre la capacidad fertilizante *in vitro* de espermatozoides murinos. Espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes (cap) durante 90 minutos con diferentes concentraciones de UPA (0-1000 ng/ml) y co-incubados (co-incub) con COCs (a) u ovocitos sin cúmulus (b) por 5 horas en presencia o ausencia de UPA. Se determinó el porcentaje de embriones de 2 células a las 20 horas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. (a) $n=5$, n.s. (b) $n=3$, n.s.

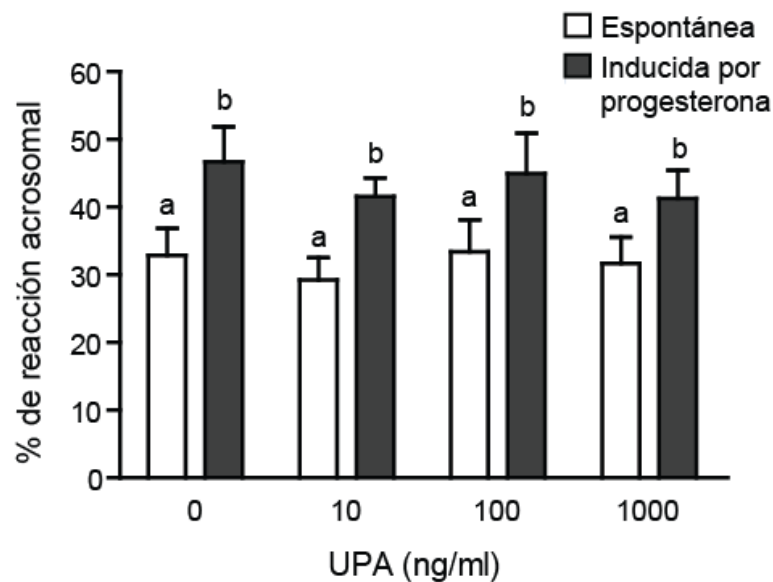


Figura 2.5 Efecto de UPA sobre la reacción acrosomal espontánea o inducida por progesterona. Espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes durante 90 minutos en presencia de diferentes concentraciones de UPA (0-1000 ng/ml). Se determinó el porcentaje de reacción acrosomal espontánea o inducida por progesterona 15 μ M por tinción con Azul Brillante de Coomassie. Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=8$. Las barras con diferentes letras indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tal como se mencionó en la Introducción, luego de la fertilización, la cigota resultante se desarrollará tras sucesivas divisiones celulares hasta el momento de la eclosión de la ZP y la interacción con el útero materno. Dado que no se conoce completamente la importancia de la progesterona y sus receptores sobre estos eventos, no podía descartarse que UPA interfiriera con un correcto desarrollo del embrión preimplantatorio. Para explorar esta posibilidad, se evaluó el desarrollo preimplantatorio *in vitro* de cigotas de ratón en presencia (1000 ng/ml) o ausencia de UPA. Se observó, por un lado, que al cuarto día de incubación los embriones alcanzaban el estadio de blastocisto casi en su totalidad tanto en presencia como en ausencia de UPA, siendo muy bajo el porcentaje de embriones detenidos en estadios previos (Fig. 2.6). Además, no se evidenciaron diferencias significativas en la cinética de desarrollo al comparar ambos tratamientos, descartando así efectos deletéreos de la droga sobre este proceso.

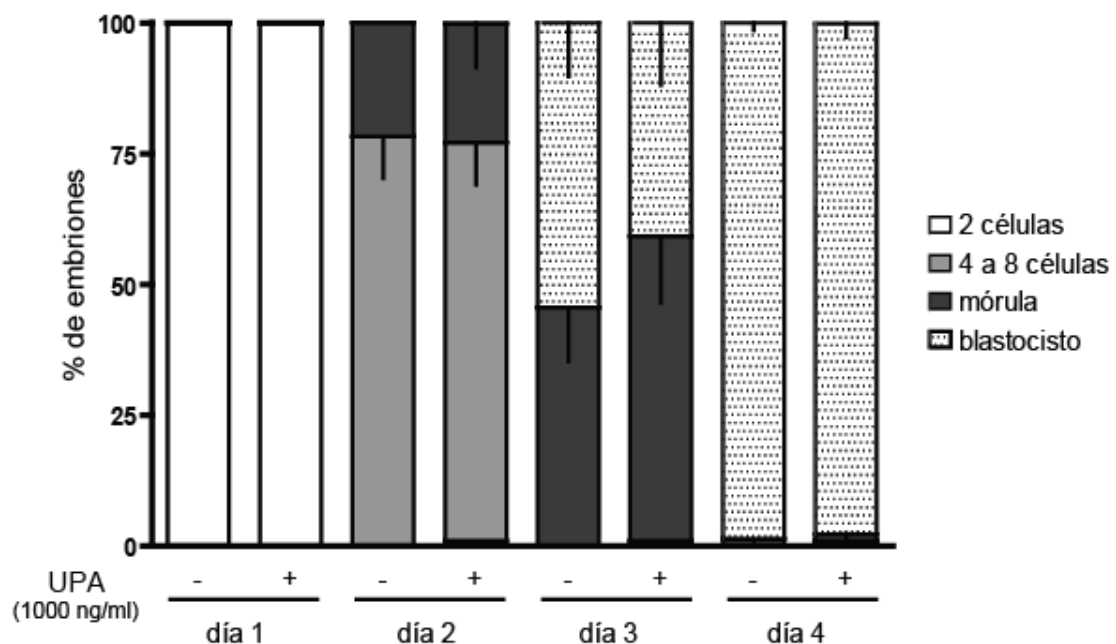


Figura 2.6 Efecto de UPA sobre el desarrollo preimplantatorio *in vitro* de embriones murinos. Cigotas de ratón obtenidas por fertilización *in vivo* fueron incubadas en medio KSOM en presencia (1000ng/ml, +) o ausencia (-) de UPA. Se determinó el porcentaje de embriones en cada estadio de desarrollo (embriones de 2, 4 y 8 células, mórulas o blastocistos) durante los siguientes 4 días. Se utilizaron entre 7 y 17 embriones por tratamiento por experimento. Los resultados se expresan como media - SEM, n=5, n.s.

Los resultados descriptos hasta el momento sugieren que UPA no afecta la fertilización ni el desarrollo embrionario *in vitro*. Sin embargo, considerando que *in vivo* el proceso de fertilización no sólo está asociado a la interacción de las gametas sino también

al transporte de los espermatozoides dentro del tracto femenino, donde interactúan con las células oviductales y adquieren su capacidad fertilizante (Yanagimachi, 1994), nos propusimos evaluar si UPA podía interferir con la capacidad fertilizante del espermatozoide *in vivo*. Para realizar estos ensayos, la administración de la droga se llevó a cabo por inyección vía intraperitoneal de una solución en aceite de sésamo, tal como fue reportado por Palanisamy y colaboradores (2006). En primer lugar, corroboramos que esta forma de administración resultara efectiva para inhibir la ovulación en las hembras de nuestra cepa híbrida (C57BL/6xBALBc)F1. Para ello, hembras adultas tratadas hormonalmente para inducir su ovulación recibieron una única dosis de UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) en el momento de la inyección de hCG (análogo al pico de LH) (Fig. 2.7.a). Bajo estas condiciones, el número de ovocitos recuperados de las hembras tratadas con UPA fue significativamente menor que el control con vehículo (Fig. 2.7.b), indicando que la administración y la distribución de la droga fueron adecuadas.

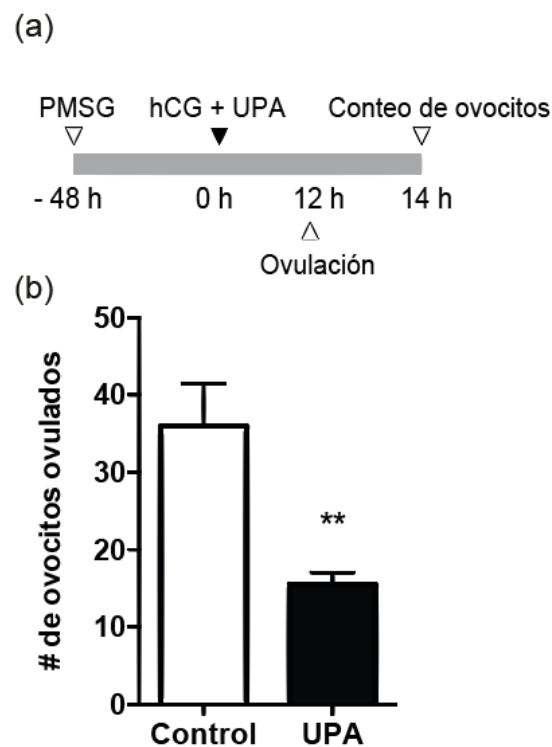


Figura 2.7 Efecto de UPA sobre la ovulación. (a) Las hembras fueron superovuladas por administración de PMSG seguida por hCG 48 horas después. Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) al mismo tiempo que la inyección de hCG, y se determinó el número de ovocitos ovulados 14 horas después (b). Los resultados se expresan como media \pm SEM, $n=6$, $**p<0.01$.

A continuación, utilizamos esta forma de administración y esta dosis para evaluar su efecto sobre el proceso de fertilización *in vivo*. Para ello, las hembras fueron superovuladas y puestas en apareo por un período corto (40 minutos), alrededor del horario en que ocurriría la ovulación. UPA o el vehículo fueron administrados justo antes o después del apareo y 7 horas después se determinó el porcentaje de fertilización (Fig. 2.8.a). En este caso, no se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos ovulados entre ambos grupos (Fig. 2.8.b), consistente con el hecho de que la ovulación ya habría tenido lugar al momento de la administración de la droga. A su vez, el porcentaje de ovocitos fertilizados no se vio afectado por la administración de UPA (Fig. 2.8.c), revelando una falta de efecto de este anticonceptivo sobre el proceso de fertilización *in vivo* en ratón.

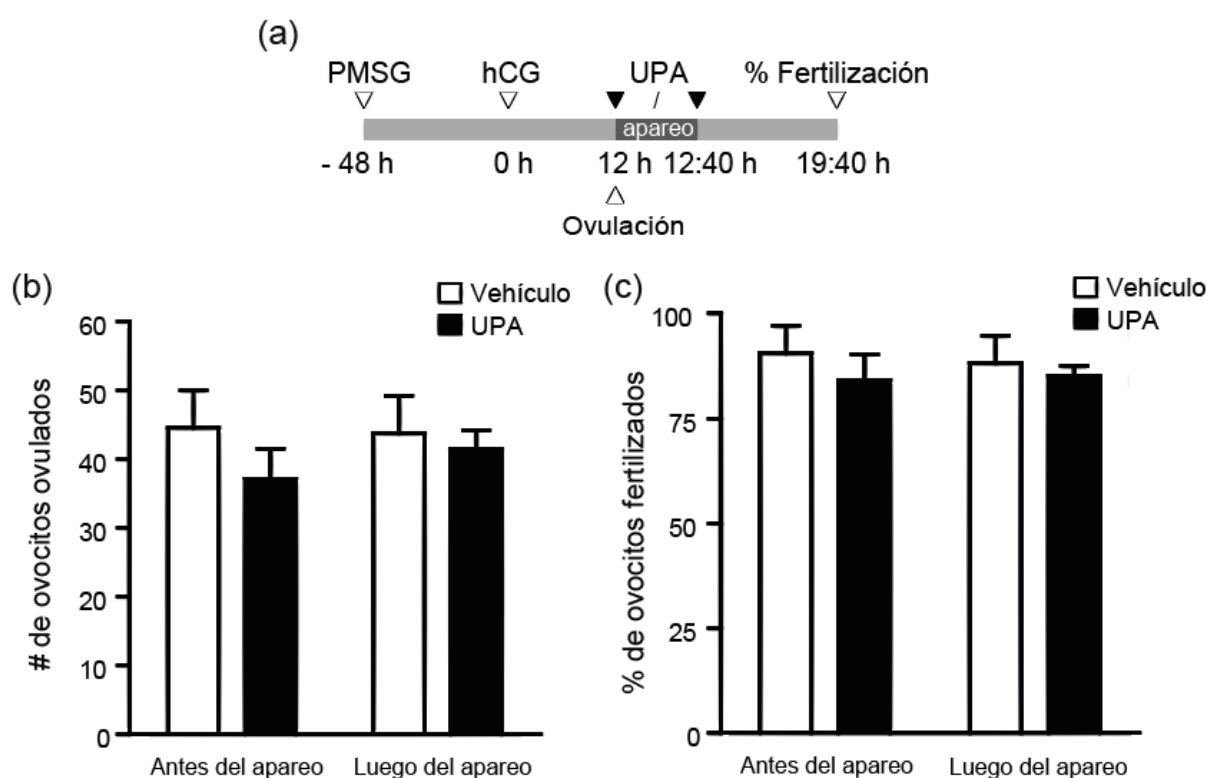


Figura 2.8 Efecto de UPA sobre la capacidad fertilizante *in vivo* de espermatozoides murinos. (a) Hembras adultas superovuladas fueron puestas en apareo con machos de fertilidad probada por 40 minutos, 12 horas después de la inyección de hCG. Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) justo antes o después del apareo, el cual fue confirmado por presencia de un tapón vaginal. Siete horas más tarde, se determinaron el número de ovocitos ovulados (b) y el porcentaje de ovocitos fertilizados por tinción con Hoechst (c). Los resultados se expresan como media \pm SEM, n=5, n.s.

Acorde a nuestros resultados, UPA no tendría efectos sobre los eventos involucrados en la interacción de gametas tanto *in vitro* como *in vivo* ni en el desarrollo

embrionario preimplantatorio *in vitro*. Sin embargo, tal como se mencionó en la Introducción, su acción antiovulatoria no permitiría justificar la alta efectividad de la droga en humanos. En función de ello, nos preguntamos si la administración de una dosis de UPA luego de ocurrida la ovulación podía prevenir la preñez en ratones. Para llevar a cabo estos estudios, en primer lugar se realizaron apareos con hembras en proestro y se consideró como día embrionario 0.5 (E0.5) a la mañana en la que se detectó el tapón vaginal, indicativo del éxito del apareo. Dado que la inyección de UPA en ese momento no era capaz de inhibir el transporte e interacción de las gametas (ver Fig. 2.8), decidimos administrar la droga un día más tarde (E1.5), momento en el cual la interacción de gametas ya habría tenido lugar, y al día E14.5 se evaluaron distintos parámetros de preñez (Fig. 2.9.a). En primer lugar, pudimos observar que, al momento de la eutanasia, la totalidad de las hembras de ambos grupos experimentales estaban preñadas. Sin embargo, aquellas que habían sido inyectadas con UPA exhibían un número significativamente menor de embriones implantados respecto al control (Fig. 2.9.b y e), a pesar de presentar un número similar de cuerpos lúteos en sus ovarios, indicativo de una tasa de ovulación similar (Fig. 2.9.c). Asimismo, aquellos embriones implantados que fueron detectados luego de ambos tratamientos presentaban, en su mayoría, aspecto, tamaño y localización normales (Fig. 2.9.d y e).

Como se observa en la Figura 2.9.b, el número de embriones implantados luego del tratamiento de UPA presentó una alta variabilidad, lo que podría deberse a una asincronía temporal entre las hembras en el momento de la ovulación y/o apareo. Por lo tanto, para evaluar esta posibilidad e intentar disminuir la variabilidad en la respuesta, se procedió a la inyección de la droga un día después (E2.5) (Fig. 2.10.a). Los resultados mostraron que al día E14.5, a diferencia de las hembras control que en su totalidad estaban preñadas, sólo un 40% (2/5) de las inyectadas con UPA presentaba embriones implantados. A su vez, estas hembras exhibieron un número significativamente menor de embriones implantados respecto a las hembras que recibieron vehículo (Fig. 2.10.b).

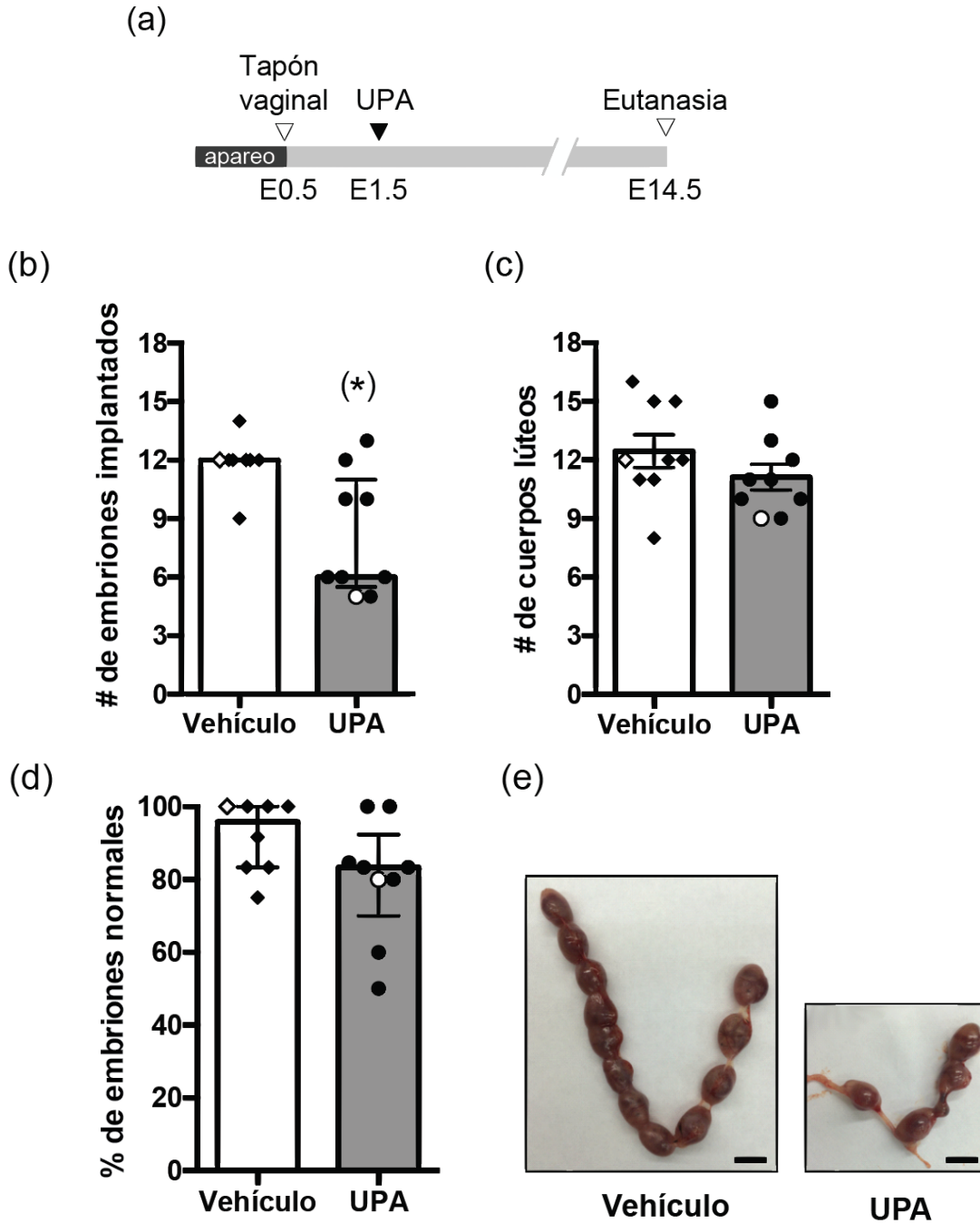


Figura 2.9 Efecto de la administración de UPA al día E1.5 sobre la preñez. (a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche con un macho fértil y el éxito del apareo fue determinado por presencia de un tapón vaginal (E0.5). Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E1.5, y en E14.5 se disecaron los úteros y los ovarios. Se determinaron el número de embriones implantados (b), el número de cuerpos lúteos en los ovarios (c) y el porcentaje de embriones de aspecto normal (d). Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil para (b) y (d) y como media \pm SEM para (c). En los paneles (b), (c) y (d) cada punto representa una hembra. $n_{\text{(vehículo)}}=8$ y $n_{\text{(UPA)}}=9$, (b) $*p<0.05$, (c) n.s., (d) n.s. (e) Imágenes representativas de los cuernos uterinos de hembras preñadas que fueron tratadas con vehículo o UPA. La hembra elegida en cada tratamiento corresponde a los símbolos abiertos en las figuras (b), (c) y (d). Barra: 1 cm.

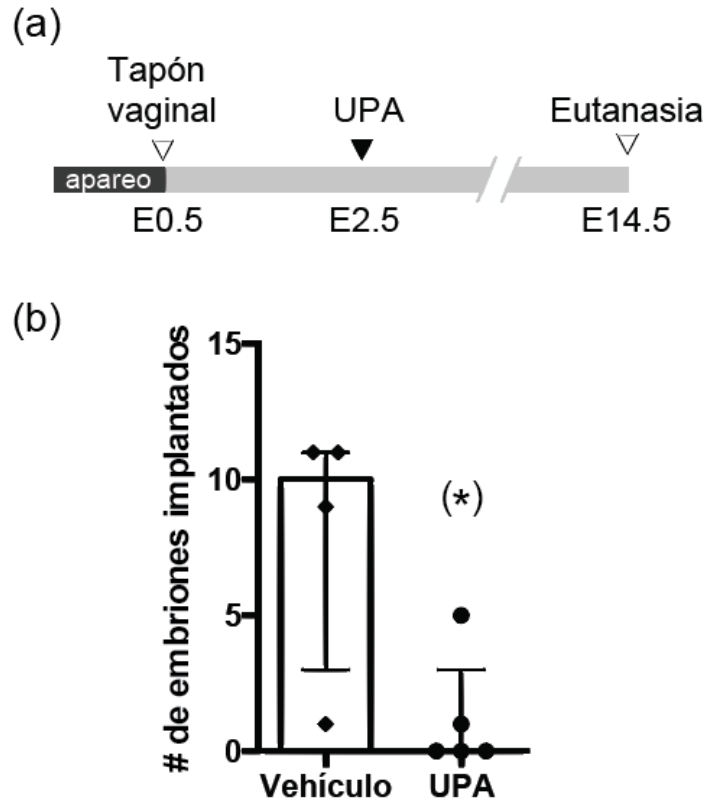


Figura 2.10 Efecto de la administración de UPA al día E2.5 sobre la preñez. (a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche con un macho fértil y el éxito del apareo fue determinado por presencia de un tapón vaginal (E0.5). Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E2.5, y en E14.5 se determinó el número de embriones implantados por hembra (b). Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil y cada punto representa una hembra. $n_{\text{vehículo}}=4$ y $n_{\text{UPA}}=5$, * $p<0.05$.

Para discernir si este resultado era consecuencia de alteraciones en la implantación o en el desarrollo embrionario posterior a la implantación, se repitió el esquema de administración de UPA, pero esta vez detectando los sitios de implantación el día E5.5, momento más cercano a la primera interacción del embrión con el útero (Fig. 2.11.a). En este caso, mientras que los controles exhibieron un número normal de sitios de implantación (comparar con Fig. 2.9.b), se evidenció una dramática reducción en este parámetro tras la administración de 40 mg/kg de UPA (Fig. 2.11.b y c). Dada la gran diferencia entre ambos tratamientos, se evaluó además el efecto de una dosis menor de UPA (10 mg/kg de peso corporal). Tras la administración de 10 mg/kg, observamos que el número promedio de sitios de implantación era significativamente menor que en las hembras tratadas con vehículo. Sin embargo, una evaluación más minuciosa de los resultados obtenidos puso en evidencia que algunas hembras (5 de 9) presentaban un

número de embriones implantados similar al de los animales control, mientras que las otras (4/9) exhibían una implantación alterada (menor número de sitios de implantación) (Fig. 2.11.b).

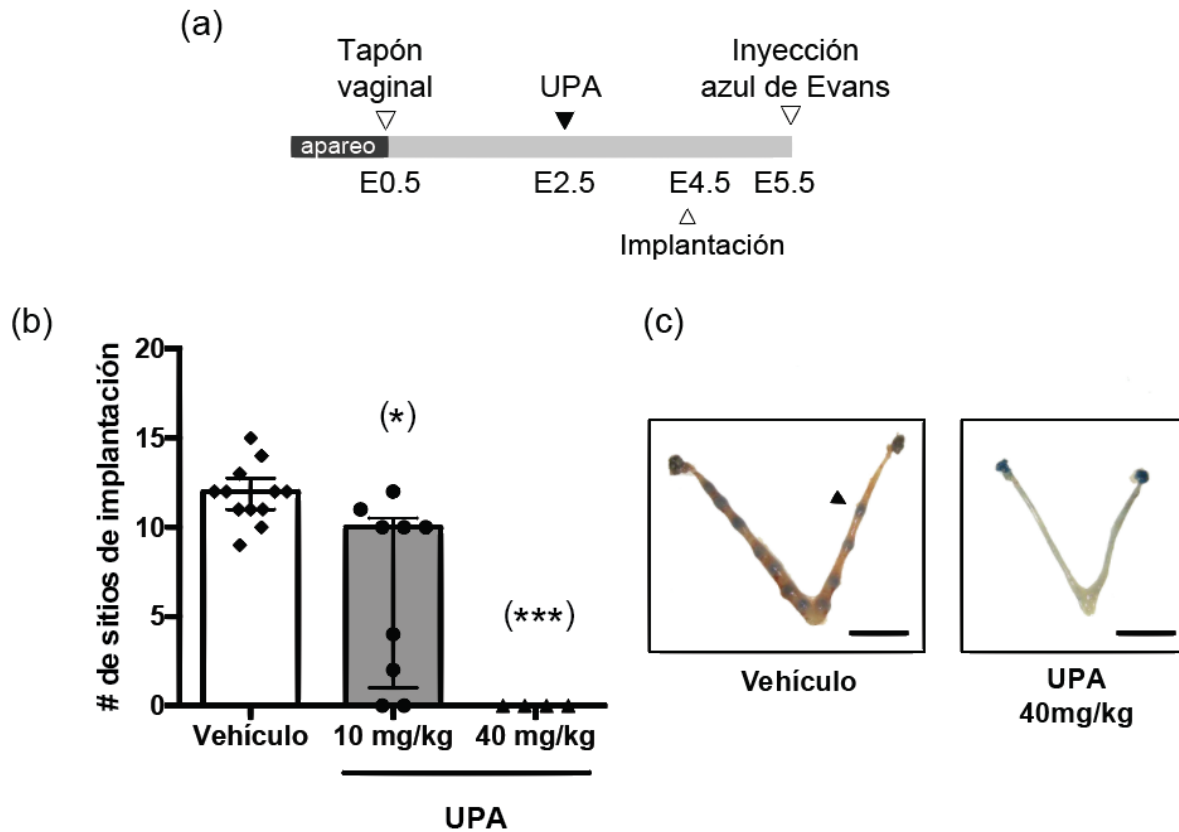


Figura 2.11 Efecto de la administración de UPA al día E2.5 sobre la implantación.

(a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche con un macho fértil y el éxito del apareo fue determinado por presencia de un tapón vaginal (E0.5). Se administró UPA (i.p., 10 ó 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E2.5, y en E5.5 se detectaron los sitios de implantación por inyección i.v. de solución de Azul de Evans 1% m/v (b). Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil y cada punto representa una hembra. $n_{\text{vehículo}}=12$, $n_{\text{UPA-10mg/kg}}=9$ y $n_{\text{UPA-40mg/kg}}=4$. * $p<0.05$, *** $p<0.001$. (c) Imágenes representativas de los cuernos uterinos de hembras apareadas y tratadas con vehículo o 40 mg/kg de UPA. La punta de flecha señala una banda azul correspondiente a un sitio de implantación temprano. Barra: 1 cm.

En función de este último resultado y considerando el efecto inhibitorio de UPA sobre el batido ciliar y la contractilidad de las Trompas de Falopio (Li et al., 2014), nos preguntamos si la disminución en la preñez en las hembras inyectadas con UPA podía deberse a un retraso o inhibición del transporte de embriones del oviducto al útero, lo que resultaría en una implantación alterada. Para estudiar esta posibilidad, se repitió el esquema de administración empleando la dosis mayor de UPA (40 mg/kg), y al día E3.5, previo a la implantación, se recuperaron los embriones por lavados de los úteros y los

oviductos, de forma de conocer su localización y su estadio de desarrollo (Fig. 2.12.a). Tanto en las hembras control como en las inyectadas con UPA se recuperó un número similar de embriones (Fig. 2.12.b), que en su totalidad se encontraban en el útero (Fig. 2.12.c). Además, en ambos casos, los mismos estaban principalmente en el estadio de blastocisto (Fig. 2.12.d), indicando que la administración de UPA no impedía el correcto desarrollo embrionario *in vivo*, tal como ocurría *in vitro* (ver Fig. 2.6).

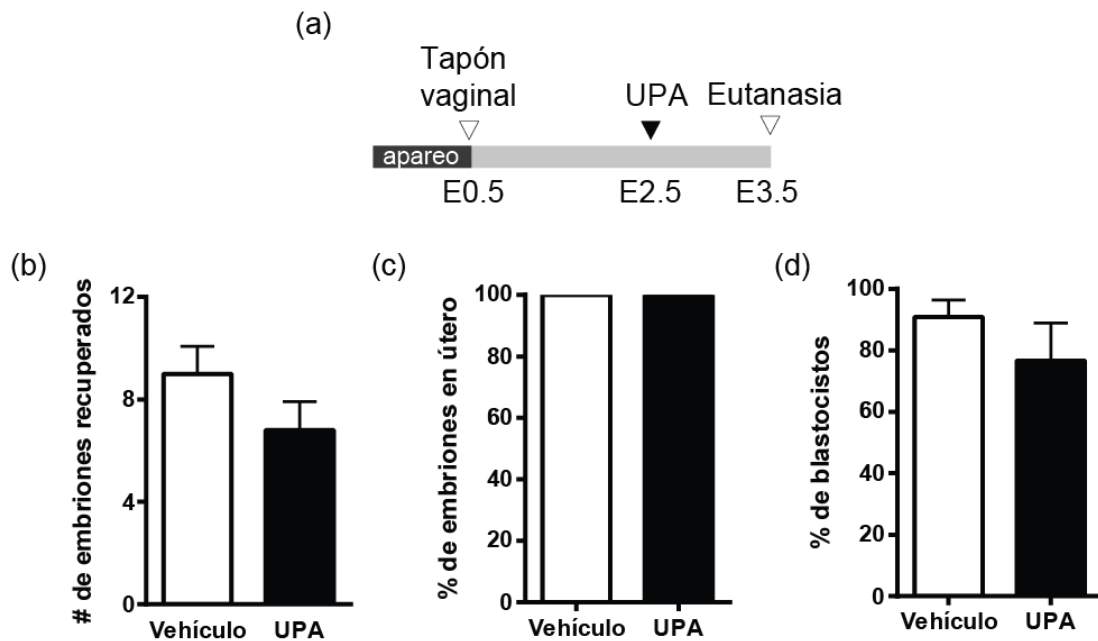


Figura 2.12 Efecto de la administración de UPA al día E2.5 sobre el transporte embrionario.

(a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche con un macho fértil y el éxito del apareo fue determinado por presencia de un tapón vaginal (E0.5). Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E2.5, y en E3.5 se realizaron lavados de los úteros y los oviductos para determinar el número total de embriones recuperados por hembra (b), el porcentaje de embriones en útero (c) y el porcentaje de embriones en estadio de blastocisto (d). Los resultados se expresan como media \pm SEM. $n_{\text{vehículo}}=4$ y $n_{\text{UPA}}=5$, n.s.

En función del resultado anterior, que sugiere que UPA no interferiría con el desarrollo y el transporte embrionario, se abría la posibilidad de que esta droga pudiera estar afectando la interacción de los embriones con el útero. Dado el rol fundamental que cumple la progesterona sobre la fisiología uterina (Namiki et al., 2018), los efectos deletéreos sobre la preñez en hembras tratadas con UPA podrían ser entonces consecuencia de una receptividad uterina alterada. Por lo tanto, en función de los estudios previos en mujeres indicando que UPA afectaba el espesor y maduración del endometrio (Stratton et al., 2000, 2010), se analizó el efecto de la droga en la morfología uterina del

ratón como una aproximación para evaluar su receptividad. Para ello realizamos un análisis histológico del útero al día E3.5 de hembras tratadas con UPA o vehículo (Fig. 2.13.a). Observamos, en primer lugar, que mientras las muestras correspondientes al control exhibían una histología homogénea (Fig. 2.13.b i-iii), la administración de UPA produjo un crecimiento asincrónico entre las glándulas y el estroma uterino (Fig. 2.13.b iv-ix). La respuesta a la administración de UPA, sin embargo, fue variable entre distintas hembras a juzgar por la apariencia histológica de las muestras. En algunos casos, mientras que la porción glandular del endometrio se encontraba preservada, el estroma estaba compacto y presentaba un patrón vascular aberrante (Fig. 2.13.b iv-vi). Por otro lado, otras muestras exhibían una respuesta pseudo-decidual en el compartimento estromal, acompañada de glándulas secretorias exhaustas (Fig. 2.13.b vii-ix).

En función de la morfología uterina anormal observada luego de la administración de UPA, decidimos estudiar si estas alteraciones estaban acompañadas de un deterioro funcional. Para ello, se evaluó la respuesta uterina a un estímulo decidualizador luego del tratamiento con UPA (Fig. 2.14.a). El estímulo consistió en una inyección intrauterina de aceite de sésamo en un cuerno uterino de hembras pseudopreñadas, mientras que el cuerno contralateral no fue estimulado, sirviendo como control. En el caso de las hembras que recibieron vehículo, la respuesta decidual se observó en forma consistente como un aumento notable en el peso del cuerno uterino estimulado (Fig. 2.14.b y c). En contraposición, los úteros de las hembras inyectadas con UPA no sufrieron una reacción decidual normal en ningún caso (Fig. 2.14.b y c). En conjunto, estos resultados sugieren que la administración de esta droga en el ratón tiene un efecto directo sobre la funcionalidad uterina normal, pudiendo impactar en su interacción con el embrión.

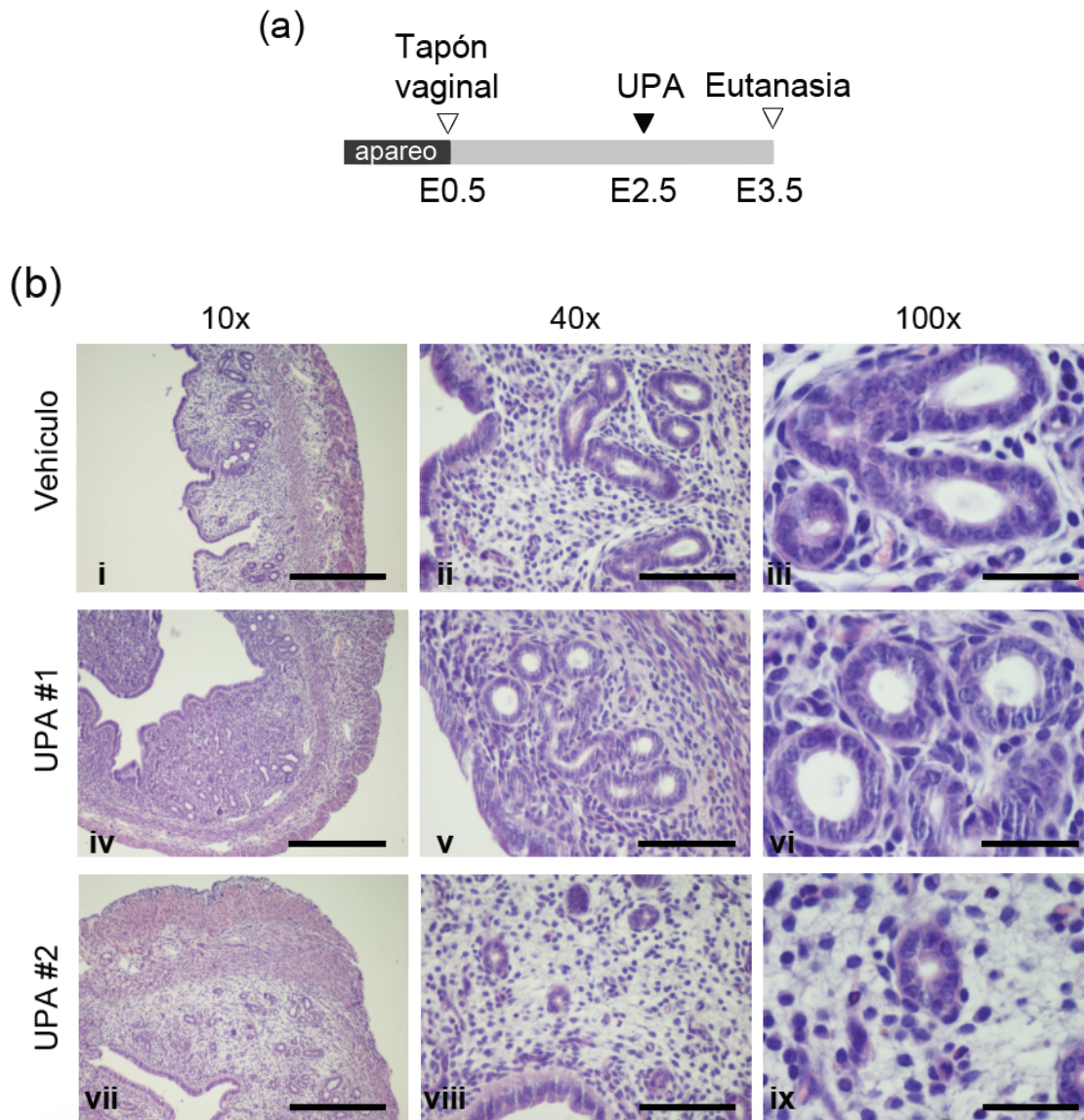


Figura 2.13 Efecto de la administración de UPA al día E2.5 sobre la morfología uterina. (a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche y el éxito del apareo fue determinado por presencia de un tapón vaginal (E0.5). Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E2.5, y en E3.5 se realizó la disección de los cuernos uterinos, su fijación y posterior procesamiento para el análisis histológico. Los cortes fueron coloreados con hematoxilina y eosina. Se observa un crecimiento asincrónico entre las glándulas endometriales y el estroma en las hembras tratadas con UPA (iv-ix) a diferencia de las hembras control (i-iii). Notar el estroma compacto en la hembra UPA#1 (iv-vi) y las glándulas secretorias exhaustas en UPA#2 (vii-ix). Barras: 500 μ m (10X); 125 μ m (40X); 50 μ m (100X).

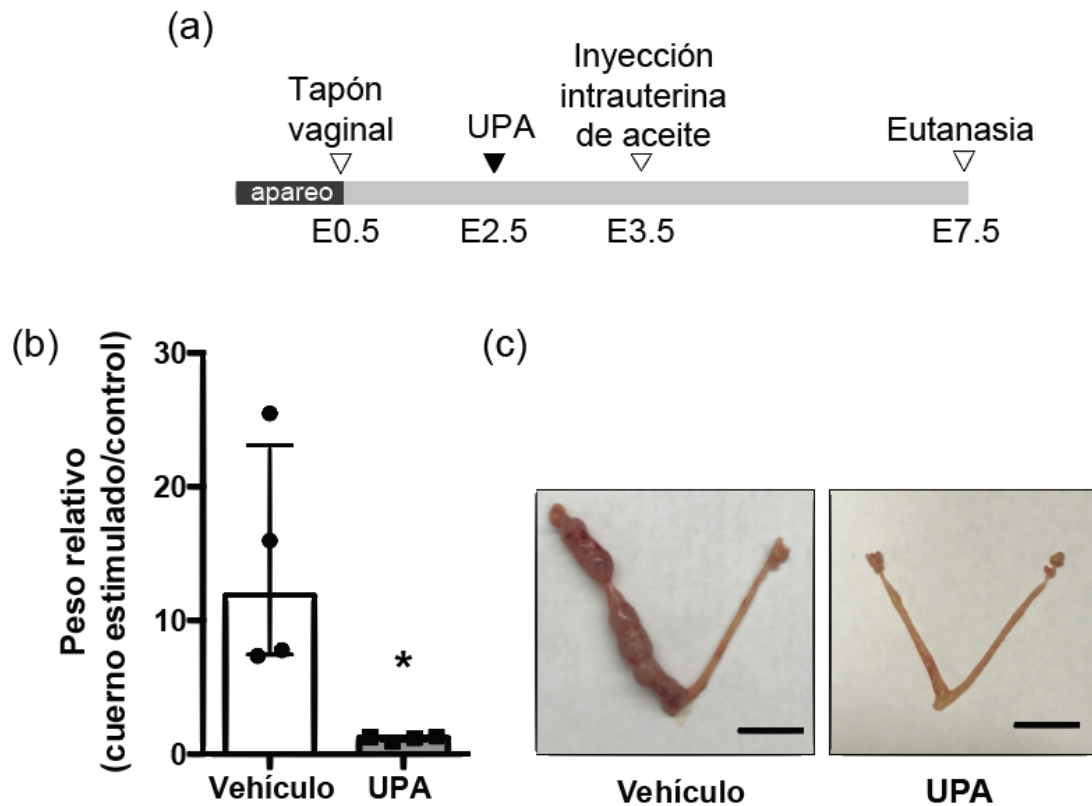


Figura 2.14 Efecto de la administración de UPA al día E2.5 sobre la deciduización.

(a) Hembras en proestro fueron puestas en apareo por una noche con un macho vasectomizado y se determinó la presencia de un tapón vaginal la mañana siguiente (E0.5). Se administró UPA (i.p., 40 mg/kg de peso corporal) o vehículo (aceite de sésamo) el día E2.5, y en E3.5 se realizó la deciduización artificial por inyección de 20 μ l de aceite de sésamo intraluminal en un cuerno uterino, mientras que el otro se utilizó como control no estimulado. El día E7.5 se disecaron los úteros y se determinó el grado de deciduización según el peso relativo del cuerno estimulado respecto al control (b). Los resultados se expresan como mediana y rango intercuartil. $n=4$, $*p<0.05$. (c) Imágenes representativas de los úteros luego de la inducción artificial de la reacción decidual en hembras apareadas y tratadas con vehículo o 40 mg/kg de UPA. El cuerno estimulado se encuentra a la izquierda en las fotografías. Barra: 1 cm.

DISCUSIÓN

En los últimos años, UPA ha emergido como el AE oral más efectivo en comparación con los métodos orales preexistentes, siendo recomendado como tratamiento de emergencia de primera línea para prevenir un embarazo no planeado (Rosato et al., 2015). Si bien el efecto de UPA sobre la ovulación en mujeres ha sido ampliamente estudiado (Stratton et al., 2000; Brache et al., 2010, 2013), aún existen controversias respecto a su mecanismo de acción. En este sentido, los resultados de esta Tesis mostraron que UPA no presentaría efectos directos sobre la funcionalidad espermática y el desarrollo embrionario preimplantatorio *in vitro* a dosis similares a las utilizadas como AE. Sin embargo, nuestros estudios *in vivo* con el modelo murino indicaron que, además de su bien descrita acción sobre la ovulación, esta droga podría tener un efecto adicional sobre la preparación endometrial y, en consecuencia, sobre la interacción embrión-útero, que contribuiría a su acción anticonceptiva.

Tal como se mencionó en la Introducción, la progesterona es capaz de modular la función espermática en los eventos asociados al proceso de capacitación durante el tránsito a través del tracto femenino y juega un rol fundamental en el proceso de fertilización (Yanagimachi, 1994; Baldi et al., 2009). Si bien las isoformas del receptor genómico de progesterona (PR-A y PR-B) no serían funcionales en el espermatozoide, ya que es transcripcionalmente inactivo, es probable que en esta célula la progesterona actúe a través de receptores no genómicos. De este modo, luego de una relación sexual sin protección y de la ingesta de una píldora de UPA, los espermatozoides podrían estar expuestos a distintas concentraciones de la droga y no puede descartarse que UPA pudiera actuar también sobre los receptores no genómicos presentes en el espermatozoide, afectando su funcionalidad. En este sentido, reportes previos y otros que surgieron durante el desarrollo de esta Tesis sugieren que UPA sólo modularía levemente la funcionalidad de espermatozoides humanos (Munuce et al., 2012, 2013; Ko et al., 2014; Guidobaldi et al., 2017). Sin embargo, la capacidad fertilizante de los mismos no había sido evaluada.

Si bien los ensayos de interacción de gametas con espermatozoides humanos debieron ser realizados con ovocitos de roedores debido a la imposibilidad ética de utilizar

material humano, los mismos habían sido previamente validados para los ensayos funcionales aquí propuestos (OMS, 2010; Battistone et al., 2014). Los resultados de esta Tesis muestran, en primer lugar, que UPA, a una concentración mayor a la encontrada en plasma luego de la ingesta de una píldora, no afectaría la capacidad fertilizante de los espermatozoides humanos. En particular, por un lado, UPA no presentó efectos deletéreos en el test de penetración de *cumulus oophorus* murino. Tal como se mencionó en la Introducción, las células del cúmulus continuamente sintetizan y secretan progesterona, la cual, entre otras funciones, induce en el espermatozoide humano la ocurrencia de la reacción acrosomal y la adquisición de una motilidad hiperactivada (Uhler et al., 1992) así como la quimiotaxis (Teves et al., 2006), eventos que serían importantes para la penetración de esta envoltura. Los resultados indican que, en nuestro sistema, las concentraciones empleadas de UPA no estarían antagonizando la acción de progesterona. Esto parece estar en aparente conflicto con un reporte reciente que indica que bajas concentraciones de UPA (0.1 ng/ml) quimio-repele a los espermatozoides humanos en presencia de un gradiente de progesterona (Guidobaldi et al., 2017). No obstante, en nuestros ensayos, los espermatozoides humanos en presencia de UPA no presentaron capacidad alterada para penetrar el cúmulus murino, que generaría un gradiente de progesterona a su alrededor. Más aún, los ensayos de fertilización tanto *in vitro* como *in vivo* en el modelo murino, exhibiendo tasas de fertilización similares en presencia o ausencia de UPA, sugieren que la quimio-repulsión tampoco tendría una contribución apreciable en ese modelo. Por otra parte, el ensayo de HOPT indicó la correcta compleción del proceso de capacitación, junto con la ocurrencia de la reacción acrosomal, la fusión y la descondensación del núcleo espermático en presencia de UPA. Estos resultados con espermatozoides humanos refuerzan los reportes previos indicando la falta de efecto de UPA en eventos asociados a la capacitación y la funcionalidad espermática (Munuce et al., 2012), lo que podría deberse al requerimiento de concentraciones mucho mayores de UPA (~10000 ng/ml) para su interacción con los sitios de unión de progesterona en la cabeza espermática, tal como lo describimos recientemente (Zumoffen et al., 2017).

Dado que el empleo de espermatozoides humanos no nos permitió estudiar el proceso de interacción de gametas en su totalidad, recurrimos al empleo del modelo murino como herramienta fundamental para la realización de estudios tanto *in vitro* como

in vivo, considerando la evidencia previa del efecto antiovulatorio de UPA en el ratón. En una primera instancia, evaluamos que el modelo murino presentara *in vitro* una respuesta a UPA similar a la observada con espermatozoides humanos. En este sentido, la presencia de UPA no produjo una disminución en las tasas de fertilización con gametas murinas tanto con como sin cúmulus, sugiriendo que en estas condiciones los espermatozoides de ratón no presentaban defectos en su capacidad fertilizante, tal como sugerían los experimentos en humano (Munuce et al., 2012; esta Tesis). Más aún, la interacción de gametas ocurrió normalmente en ausencia de cúmulus, situación más restrictiva que pone en evidencia deficiencias en la capacidad fertilizante del espermatozoide (Nishimura et al., 2004; Da Ros et al., 2008), y en la que tanto la capacitación como la fertilización ocurrían en ausencia de progesterona. Estos resultados indican que UPA no interferiría en el proceso de fertilización tanto en presencia como en ausencia de la progesterona secretada por el cúmulus. Asimismo, el hecho de que la reacción acrosomal inducida por progesterona no fuera prevenida por UPA sugiere que, en el espermatozoide murino, la interacción de esta hormona con su receptor no sería antagonizada por UPA en las concentraciones evaluadas. En conjunto, los resultados *in vitro* con gametas murinas están en concordancia con las evidencias previas y las reportadas en esta Tesis respecto a los espermatozoides humanos: UPA no tendría efecto directo sobre la adquisición de la capacidad fertilizante que ocurre como consecuencia de la capacitación espermática, ni tampoco sobre su interacción con la gameta femenina.

Una vez descartados los efectos deletéreos sobre la interacción de gametas, nos dispusimos a evaluar el impacto de UPA sobre el desarrollo embrionario preimplantatorio. Si bien es controversial el efecto de P sobre este proceso debido a reportes exhibiendo resultados contradictorios (Whitten, 1957; Roblero, 1973; Roblero y Izquierdo, 1976; Zhang y Murphy, 2014), se ha visto que el antiprogestágeno mifepristona retarda el desarrollo embrionario tanto *in vitro* como *in vivo* (Roblero et al., 1987; Yang y Wu, 1990). Teniendo en cuenta la similitud estructural y funcional entre este compuesto y UPA, era posible que la droga aquí estudiada se comportara de forma similar. No obstante, nuestros experimentos mostraron una falta de efecto de UPA sobre el desarrollo embrionario preimplantatorio, evidenciado por una similar cinética de desarrollo y tasa de clivaje hasta blastocisto respecto al control, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Una vez llevados a cabo los experimentos *in vitro* y considerando la imposibilidad de realizar estudios *in vivo* en humanos, se diseñó un protocolo de fertilización *in vivo* continuando con el ratón como modelo experimental. El efecto antiovulatorio de UPA fue confirmado en primer lugar, inyectándola junto con la hCG y observando una disminución en el número de ovocitos ovulados. La inhibición de la ovulación observada, sin embargo, fue menor que la reportada previamente (Palanisamy et al., 2006; Nallasamy et al., 2013) lo que podría deberse a que estos estudios fueron realizados sobre ratonas prepúberes (<30 días de edad). En contraposición, para esta Tesis se consideró más apropiado el empleo de ratonas adultas teniendo en cuenta que los AE son administrados a mujeres en edad fértil. Para nuestro sistema, elegimos la dosis de 40 mg/kg utilizada previamente para inhibir la ovulación (Palanisamy et al., 2006; Nallasamy et al., 2013), ya que dosis menores producían efectos más suaves. Al hacer la conversión de la píldora de 30 mg de UPA a la dosis equivalente en ratón, la misma resultaría en una dosis de 6-7 mg/kg (Reagan-Shaw et al., 2008). Si bien en nuestros experimentos *in vivo* la dosis utilizada fue mayor que la equivalente calculada, la misma fue la necesaria para producir en el ratón el efecto biológico que ejerce la píldora en humanos y, por ello, fue la elegida para realizar la totalidad de los estudios. El hecho de requerir una dosis más alta en el ratón puede deberse a que los roedores tienen tasas de metabolización y eliminación mucho más altas que los humanos (Nau, 1986).

El efecto antiovulatorio de la droga no se observó cuando la misma fue inyectada justo antes o después de un apareo, consistente con el hecho de que esta acción está limitada a la administración previa al pico de LH/hCG (Brache et al., 2013). La tasa de fertilización, por otra parte, no se vio modificada por UPA en ninguno de los esquemas de inyección testeados, descartando que el proceso de fertilización *in vivo* se viera afectado por las concentraciones circulantes de UPA en la hembra. Más aún, el hecho de que la administración de UPA justo antes del apareo no produjera una disminución en el porcentaje de fertilización sugiere que este AE no afectó el transporte rápido de los espermatozoides murino en el tracto femenino (Suarez y Pacey, 2006). Si bien se han descrito efectos inhibitorios *in vitro* de UPA sobre el batido ciliar y la contracción muscular de las Trompas de Falopio (Li et al., 2014), nuestros estudios muestran que, de existir *in vivo*, no tendrían impacto sobre el transporte e interacción de las gametas en ratón. En

conjunto, estos resultados constituyen la primera evidencia *in vivo* mostrando que la administración de UPA luego de la ovulación no afectaría el transporte espermático y el proceso de fertilización.

El hecho de que UPA no presentara efectos deletéreos sobre el proceso de fertilización y el desarrollo embrionario los descarta como posibles mecanismos alternativos para su acción anticonceptiva. No obstante, debido a su alta efectividad, en estos últimos años ha surgido controversia respecto a la existencia de posibles efectos de UPA sobre la receptividad endometrial, sugiriendo efectos anti-implantatorios de la droga (Mozzanega et al., 2013). A pesar de que estudios recientes *in vitro* reportaron que la interacción embrión-endometrio no estaría alterada en presencia de UPA (Berger et al., 2015; Li et al., 2017), los modelos experimentales empleados para realizar el co-cultivo son limitados y no representan completamente el complejo proceso de implantación en el que están involucrados muchos otros tipos celulares ausentes en los modelos *in vitro*. Continuando entonces con el uso del ratón como modelo pre-clínico, observamos que la administración de una dosis post-ovulatoria de UPA, tanto uno como dos días luego del apareo, producía una disminución significativa en el número embriones implantados respecto al control, a pesar de observar un número similar de ovocitos ovulados. Esto sugiere que, efectivamente, UPA podría presentar efectos adicionales al descrito sobre la ovulación, dependiendo del momento de su administración. Reportes previos mostraron que una dosis alta post-ovulatoria prevenía la preñez en ratas y conejos al ser administrada el día 4 o 5 de preñez, correspondiendo al período post- (rata) o peri- (conejo) implantatorio (Reel et al., 1998; Hild et al., 2000). Si bien estos resultados apoyan el efecto deletéreo de anti-progestágenos sobre la preñez, no imitan la situación en el humano en la que la píldora de UPA puede ser tomada hasta 5 días luego de ocurrida la relación sexual, lo que representa aproximadamente dos tercios del período pre-receptivo, considerando que la implantación ocurre entre 7 y 10 días luego de la ovulación (ver Fig. 10 en Introducción). En nuestro modelo, UPA fue administrado a las ratonas los días E1.5 o E2.5, lo que representa un tercio y dos tercios del período pre-receptivo, respectivamente, sabiendo que la implantación ocurre al final del día 4 en esta especie (ver Fig. 10 en Introducción). Por lo tanto, el esquema de administración en nuestro modelo se asemejaría a la situación en las usuarias de UPA.

El hecho de que los efectos observados en ratón sean producto de una única dosis administrada varios días antes de la implantación, junto con que los fetos detectados en hembras tratadas con UPA presentaban un desarrollo aparentemente normal, sugiere que el efecto post-ovulatorio estaría asociado al establecimiento de la preñez más que al mantenimiento de la misma. La evaluación de los sitios de implantación tempranos en el día E5.5 nos permitió corroborar esta posibilidad, al evaluar si la adhesión de los embriones ocurría normalmente en las hembras tratadas con UPA. La detección de un menor número de embriones implantados en este momento respecto a los controles indicó alteraciones en eventos pre- o peri-implantatorios. Si bien se obtuvieron respuestas robustas a lo largo del experimento al administrar 40 mg/kg, los resultados fueron más variables al utilizar una dosis más baja de UPA (10 mg/kg) (ver Fig. 2.11.b), similar a la dosis equivalente en ratón calculada para la píldora. Sin embargo, esta variabilidad es consistente con un reciente ensayo clínico finalizado en julio de 2018 (ClinicalTrials.gov, NCT02517463) mostrando que la administración de la píldora de 30 mg es capaz de prevenir un embarazo luego de la ovulación, aunque con menor efectividad que la ingesta pre-ovulatoria. Por lo tanto, el abordaje experimental utilizado en nuestros estudios resultaría apropiado para imitar la situación en humanos.

Tal como se mencionó previamente, el posible efecto inhibitorio de UPA sobre la contractilidad y funcionalidad oviductal (Li et al., 2014) no tendría impacto sobre el transporte de las gametas en el ratón. Sin embargo, el batido ciliar y las contracciones musculares también son cruciales para el transporte del embrión al útero (Lyons et al., 2006). Nuestros resultados, no obstante, muestran que el menor número de sitios de implantación detectados no sería consecuencia de un transporte embrionario alterado ya que los embriones colectados al día E3.5 se encontraban en su totalidad en el útero, en estadio de blastocisto. Este resultado sería consistente con el hecho de que el riesgo de un embarazo ectópico luego de ingerir la píldora no sería mayor que el observado en la población general (Levy et al., 2014).

Así como la progesterona cumple una función fundamental sobre el proceso de fertilización, también lo hace en la implantación, actuando sobre la adquisición de la receptividad endometrial, la adhesión del embrión y la decidualización (Ramathal et al., 2010). En el ratón, los niveles de progesterona comienzan a aumentar el tercer día de

preñez, cambiando de un fenotipo endometrial proliferativo a diferenciado, con la remodelación estructural necesaria para la adhesión e invasión del embrión (Bhurke et al., 2016). En nuestro esquema experimental, la implantación estaba afectada en todas las hembras que recibieron UPA el día E2.5, mientras que la mitad de las hembras tratadas el día E1.5 presentaron menor cantidad de embriones implantados respecto al control. Por lo tanto, es posible que la inyección de UPA más cercana al momento en que aumentaban los niveles de progesterona previniera la diferenciación endometrial necesaria para la implantación. El tratamiento con UPA luego de la ovulación produjo alteraciones en la morfología uterina. En particular, los estudios histológicos pusieron en evidencia una combinación desincronizada de elementos glandulares y estromales en los úteros de las hembras tratadas con UPA, lo que podría ser causante de los defectos detectados en el proceso de implantación. Es importante destacar que los cambios hormonales de ambos compartimientos del endometrio se encuentran finamente regulados durante todo el ciclo reproductivo (Patel et al., 2015) y la desregulación de este “*cross-talk*” entre glándulas y estroma puede alterar la sincronización necesaria para una correcta funcionalidad del endometrio. En este sentido, estudios previos realizados en mujeres habían descrito una acción directa de UPA sobre el espesor endometrial al ser ingerido en la fase luteal temprana (Stratton et al., 2010) o media (Passaro et al., 2003). Más aún, su uso prolongado en bajas dosis para el tratamiento de miomas resultó en alteraciones histológicas con presencia de epitelio glandular inactivo, arquitectura glandular alterada y vasculatura estromal aberrante (Williams et al., 2012). Nuestro modelo, exhibiendo un fenotipo similar en cuanto a las alteraciones en la morfología uterina, apoyaría la existencia de efectos directos de UPA sobre la fisiología del útero.

A pesar de las posibles alteraciones endometriales que produciría la ingesta de UPA, hasta el momento la posibilidad de que las mismas impacten sobre la receptividad uterina no ha sido evaluada en humanos. Nuestros experimentos en ratón mostraron que, además de las alteraciones morfológicas descritas, los úteros de las hembras tratadas con UPA presentaban un claro defecto para sufrir la reacción decidual, pre-requisito para una implantación exitosa. En este sentido, durante el transcurso de esta Tesis, se reportaron análisis genómicos de biopsias endometriales provenientes de mujeres que recibieron una dosis única de UPA justo antes de la ruptura folicular. Estas muestras exhibían cambios en

la expresión génica compatibles con un fenotipo endometrial no receptivo (Lira-Albarrán et al., 2017) y cambios en genes involucrados en el proceso de decidualización endometrial (Lira-Albarrán et al., 2018). En conjunto, nuestros resultados *in vivo* están en concordancia con los efectos descritos para las muestras de origen humano, apoyando el uso del modelo murino para estos estudios. Cabe destacar, además, que la acción de UPA sobre el tejido uterino que observamos se asemeja al fenotipo reproductivo de ratonas deficientes en el receptor PR-A, incapaces de sufrir la decidualización en el estroma (Mulac-Jericevic et al., 2000), indicativo de una función crucial de este receptor para la función normal del estroma y el epitelio endometrial. En contraposición, la falta de PR-B no afecta la capacidad del útero de mantener la preñez (Mulac-Jericevic et al., 2003). Más aún, estudios en células humanas de cáncer de mama mostraron que UPA induce un efecto antiproliferativo en ausencia de PR-B, sugiriendo la importancia de la isoforma PR-A para la acción de esta droga (Esber et al., 2015). Por lo tanto, todas estas evidencias apuntan a que, en nuestro sistema, la acción de UPA sobre el tejido uterino sería principalmente a través de PR-A.

En conjunto, la totalidad de los resultados obtenidos en el Capítulo II de esta Tesis se resumen en la Tabla 2.1. Los mismos revelaron principalmente que, a pesar de no afectar los eventos de interacción de gametas y el desarrollo preimplantatorio, UPA, en un esquema de administración similar al de las mujeres, presentaría un mecanismo anticonceptivo adicional en el modelo murino por sus efectos sobre la preparación endometrial para la implantación. Nuestros ensayos no sólo son consistentes con las evidencias en el humano sino que además proveen información respecto a los posibles mecanismos involucrados en la acción anticonceptiva post-ovulatoria reportada en el ensayo clínico antes mencionado. Por lo tanto, los resultados descritos en esta Tesis podrían ser críticos para comprender los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la actividad anticonceptiva de UPA.

Evento	Acción de UPA
Ovulación	Inhibición Consistente con observaciones en ratón y humano (Stratton et al., 2000; Palanisamy et al., 2006; Brache et al., 2010, 2013; Nallasamy et al., 2013)
Transporte espermático	Sin efecto
Interacción de gametas	Sin efecto Tanto en ratón (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) como en humano (<i>in vitro</i>)
Desarrollo embrionario preimplantatorio	Sin efecto (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
Transporte embrionario	Sin efecto
Morfología uterina	Alteraciones Consistente con observaciones en humanos (Stratton et al., 2000, 2010)
Decidualización	Inhibición Consistente con estudios génicos en humanos (Lira-Albarrán et al., 2018)
Implantación	Inhibición Consistente con estudios génicos de receptividad uterina en humanos (Lira-Albarrán et al., 2017)

Tabla 2.1 Resumen de los efectos de UPA en el proceso reproductivo evaluados en el Capítulo II. En caso de no ser especificado, los mismos refieren a estudios *in vivo* en ratón.

Discusión general y palabras finales

Los resultados descriptos en esta Tesis doctoral logran el aporte de nuevos conocimientos acerca del proceso reproductivo, a través del estudio de la fisiología de la activación ovocitaria y del mecanismo de acción de un regulador de la fertilidad.

En el Capítulo I, enfocado en los mecanismos involucrados en la activación ovocitaria, se describieron algunos moduladores de la exposición del fosfolípido PS en el oolema del ovocito fertilizado de ratón, tales como el calcio y el citoesqueleto de actina, y su posible implicancia en la regulación de un novedoso proceso endocítico en el ovocito posterior a la exocitosis cortical. Estos resultados pusieron en evidencia que, durante la activación del ovocito, aún existen muchos eventos celulares y moleculares que no han sido dilucidados y que podrían ser cruciales para el correcto desarrollo del embrión resultante.

El Capítulo II, por otra parte, se centró en el estudio de posibles blancos de UPA en el proceso reproductivo, además de la ovulación, que justificaran su alta acción anticonceptiva. Los resultados revelaron que, si bien no afectaría la funcionalidad espermática, la interacción de las gametas o el desarrollo del embrión resultante, la administración post-ovulatoria de UPA podría alterar la fisiología del útero, haciéndolo menos receptivo para el proceso de implantación. Estos resultados proveen información novedosa sobre el mecanismo de acción de UPA como AE con potenciales implicancias clínicas, y son consistentes con la evidencia empírica de su alta efectividad hasta 5 días luego de ocurrida la relación sexual.

La información recabada durante el desarrollo de esta Tesis no sólo aumenta el conocimiento en estos temas específicos, sino que en forma traslativa resalta las necesidades socioculturales y políticas de estrategias de planificación familiar tanto en Argentina como en el resto del mundo. Tal como se mencionó en la Introducción, los programas de planificación familiar promueven que los individuos puedan decidir el número de hijos que desean tener y el intervalo entre los embarazos, a través del uso de procedimientos para tratar la infertilidad y de métodos anticonceptivos (OMS, 2018a). Si bien permite que cualquier persona tome decisiones conscientes respecto a su salud sexual y reproductiva, su promoción es particularmente importante para las mujeres que, por factores socioculturales, históricamente no han podido beneficiarse de servicios de salud de calidad. Más aún, en diversas culturas, como consecuencia de las desigualdades en las relaciones de poder entre géneros, la mujer es considerada responsable si una pareja no

puede concebir, aun cuando muchas veces la infertilidad es debida a factores masculinos (Agarwal et al., 2015).

En Argentina, las técnicas de fertilización asistida se practican desde la década del '80, realizándose miles de procedimientos cada año (SAMeR, 2015). Más aún, el acceso a estos tratamientos ha incrementado con la aprobación de la Ley 26.862 de reproducción médicamente asistida en 2013. Sin embargo, si bien mundialmente los procedimientos de fertilización *in vitro* e ICSI se realizan en forma rutinaria, aún no existen tratamientos aprobados para fallas en la activación ovocitaria. Tal como se mencionó previamente, el uso de los ionóforos de calcio en forma experimental ha conllevado a embarazos clínicos y nacimientos, incluso en Argentina (Lorenzo et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados con el modelo pre-clínico murino abren la posibilidad de que este reactivo produzca diferencias en la activación respecto a la desencadenada por el espermatozoide. Asimismo, a pesar de que los fenómenos descriptos en esta Tesis no pudieron ser evaluados por fertilización por ICSI, se ha reportado que esta técnica no induciría completamente los fenómenos que ocurren en la membrana del ovocito luego de la fusión de las gametas (Maleszewski et al., 1996; Wortzman-Show et al., 2007; Bianchi et al., 2014). Por lo tanto, los Resultados del Capítulo I, junto con las evidencias previas, sugieren que el uso de estos tratamientos debería ser cauteloso, dado que es poco lo que aún se conoce acerca de sus posibles efectos a largo plazo.

Por otra parte, si bien el uso de anticonceptivos ha aumentado en muchas partes del mundo, se estima que el 40% de los embarazos es no planeado y que más del 50% de los mismos termina en aborto (Sedgh et al., 2014, 2016; Bearak et al., 2018). Asimismo, se calcula que más de 200 millones de mujeres fértiles de países en desarrollo desean posponer o prevenir el embarazo, pero no utilizan ningún método anticonceptivo moderno debido a la poca variedad de métodos existentes o un acceso limitado a los mismos; errores de principio por parte de los usuarios o los proveedores; barreras de género; el temor de posibles efectos colaterales; o incluso debido a su oposición por cuestiones religiosas o culturales (OMS, 2018a). En este sentido, tal como lo indica la OMS, todas las mujeres y niñas que corrieran el riesgo de un embarazo no deseado tienen derecho a la anticoncepción de emergencia, la cual debería estar integrada en los programas nacionales de planificación familiar (OMS, 2018b). En particular, la necesidad de AE altamente

efectivos es aún mayor en países que no cuentan con una legislación que regule la posibilidad de practicar la interrupción temprana del embarazo en forma segura.

En Argentina, el único AE oral disponible actualmente es la pastilla de LNG, la cual forma parte de los métodos que distribuye el Programa Nacional de Salud Sexual y Procreación Responsable a partir de 2007, y que debe ser ofrecida de manera gratuita en centros de atención primaria y hospitales públicos. Sin embargo, a pesar de que este Programa indica que el LNG posee cierta acción anticonceptiva hasta 5 días luego de ocurrida la relación sexual, su efectividad en esta ventana temporal es mucho menor que la demostrada para UPA (Glasier et al., 2010), distribuido ampliamente en países desarrollados. Los Resultados del Capítulo II sugieren que la mayor efectividad de UPA respecto al LNG podría estar dada por un efecto inhibitorio sobre la receptividad uterina, ampliando la ventana de acción a momentos previos a la implantación del embrión. Por lo tanto, UPA resultaría una mejor alternativa a la pastilla de LNG que se distribuye actualmente en Argentina.

En conjunto, consideramos que los resultados presentados en esta Tesis constituyen un importante aporte al conocimiento de la fisiología reproductiva, ya que podrían contribuir al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o tratamiento para fallas en la activación ovocitaria, y a la mayor aceptación de la píldora de UPA como AE.

Referencias

- Abrieu, A., M. Dorée, A. Picard. 1997. Mitogen-activated protein kinase activation down-regulates a mechanism that inactivates cyclin B-cdc2 kinase in G2-arrested oocytes. *Mol. Biol. Cell.* 8:249–61.
- Adenot, P.G., Y. Mercier, J.P. Renard, E.M. Thompson. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development.* 124:4615–25.
- Agarwal, A., A. Mulgund, A. Hamada, M.R. Chyatte. 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13:37.
- Alberio, R., V. Zakhartchenko, J. Motlik, E. Wolf. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45:797–809.
- Ando, T., M. Yamasaki, K. Suzuki. 1973. Protamines. Isolation, characterization, structure and function. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 12:1–114.
- Arts, E.G., J. Kuiken, S. Jager, D. Hoekstra. 1993. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217:1001–9.
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* 4:581–96.
- Austin, C.R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 170:326.
- Austin, C.R. 1972. Reproduction in Mammals. University Press, Cambridge.
- Austin, C.R. 1985. Sperm maturation in the male and female genital tracts. *Biol. Fertil.* 121–55.
- Avella, M.A., B. Baibakov, J. Dean. 2014. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J. Cell Biol.* 205:801–809.
- Avella, M.A., B. Xiong, J. Dean. 2013. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 19:279–289.
- Backs, J., P. Stein, T. Backs, F.E. Duncan, C.E. Grueter, J. McNally, X. Qi, R.M. Schultz, E.N. Olson. 2010. The isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:81–86.
- Balasubramanian, K., B. Mirnikjoo, A.J. Schroit. 2007. Regulated Externalization of Phosphatidylserine at the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* 282:18357–18364.
- Baldi, E., M. Luconi, M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino, G. Forti. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 308:39–46.
- Baluch, D.P., B.A. Koeneman, K.R. Hatch, R.W. McGaughey, D.G. Capco. 2004. PKC isoforms in post-activated and fertilized mouse eggs: association with the meiotic spindle. *Dev. Biol.* 274:45–55.
- Battistone, M.A., A. Alvau, A.M. Salicioni, P.E. Visconti, V.G. Da Ros, P.S. Cuasnicu. 2014. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 20:1054–1066.
- Battistone, M.A., V.G. Da Ros, A.M. Salicioni, F.A. Navarrete, D. Krapf, P.E. Visconti, P.S. Cuasnicu. 2013. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol. Hum. Reprod.* 19:570–580.
- Bazer, F.W., T.E. Spencer, G.A. Johnson, R.C. Burghardt, G. Wu. 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 138:195–209.
- Bearak, J., A. Popinchalk, L. Alkema, G. Sedgh. 2018. Global, regional, and subregional trends in unintended pregnancy and its outcomes from 1990 to 2014: estimates from a Bayesian hierarchical model. *Lancet*

- Glob. Heal.* 6:e380–e389.
- Becker, K.A., N.H. Hart. 1999. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1):97–110.
- Bedford, J.M. 1979. Mechanisms of conception: the maturation and interaction of mammalian gametes. *Mead Johnson Symp. Perinat. Dev. Med.* 7–17.
- Bedford, J.M. 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79:429–60.
- Bell, C.E., M.D. Calder, A.J. Watson. 2008. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol. Hum. Reprod.* 14:691–701.
- Bello, O.D., A.I. Cappa, M. de Paola, M.N. Zanetti, M. Fukuda, R.A. Fissore, L.S. Mayorga, M.A. Michaut. 2016. Rab3A, a possible marker of cortical granules, participates in cortical granule exocytosis in mouse eggs. *Exp. Cell Res.* 347:42–51.
- Bement, W.M., H. Benink, C.A. Mandato, B.B. Swelstad. 2000. Evidence for direct membrane retrieval following cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes and eggs. *J. Exp. Zool.* 286:767–75.
- Berger, C., N.R. Boggavarapu, J. Menezes, P.G. Lalitkumar, K. Gemzell-Danielsson. 2015. Effects of ulipristal acetate on human embryo attachment and endometrial cell gene expression in an in vitro co-culture system. *Hum Reprod.* 30:800–811.
- Bernhardt, M.L., E. Padilla-Banks, P. Stein, Y. Zhang, C.J. Williams. 2017. Store-operated Ca²⁺ entry is not required for fertilization-induced Ca²⁺ signaling in mouse eggs. *Cell Calcium.* 65:63–72.
- Bernhardt, M.L., P. Stein, I. Carvacho, C. Krapp, G. Ardestani, A. Mehregan, D.M. Umbach, M.S. Bartolomei, R.A. Fissore, C.J. Williams. 2018. TRPM7 and CaV3.2 channels mediate Ca²⁺ influx required for egg activation at fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115:E10370–E10378.
- Bernhardt, M.L., Y. Zhang, C.F. Erxleben, E. Padilla-Banks, C.E. McDonough, Y.-L. Miao, D.L. Armstrong, C.J. Williams. 2015. CaV3.2 T-type channels mediate Ca²⁺ entry during oocyte maturation and following fertilization. *J. Cell Sci.* 128:4442–4452.
- Beyers, E.M., P. Comfurius, D.W. Dekkers, R.F. Zwaal. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1439:317–30.
- Bhurke, A.S., I.C. Bagchi, M.K. Bagchi. 2016. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 75:237–245.
- Bianchi, E., B. Doe, D. Goulding, G.J. Wright. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 508:483–487.
- Bianchi, E., R. Geremia, C. Sette. 2010. Expression of stemness markers in mouse parthenogenetic-diploid blastocysts is influenced by slight variation of activation protocol adopted. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46:619–23.
- Bianchi, E., G.J. Wright. 2014. Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370:20140101–20140101.
- Biggers, J.D. 1971. Metabolism of mouse embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 14:41–54.
- Blackmore, P.F., S.J. Beebe, D.R. Danforth, N. Alexander. 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem.* 265:1376–1380.
- Blackmore, P.F., J. Neulen, F. Lattanzio, S.J. Beebe. 1991. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem.* 266:18655–18659.

- Blithe, D.L., L.K. Nieman, R.P. Blye, P. Stratton, M. Passaro. 2003. Development of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914 for clinical indications. *Steroids*. 68:1013–1017.
- Boivin, J., L. Bunting, J.A. Collins, K.G. Nygren. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod.* 22:1506–1512.
- Brache, V., L. Cochon, M. Deniaud, H.B. Croxatto. 2013. Ulipristal acetate prevents ovulation more effectively than levonorgestrel: analysis of pooled data from three randomized trials of emergency contraception regimens. *Contraception*. 88:611–618.
- Brache, V., L. Cochon, C. Jesam, R. Maldonado, A.M. Salvatierra, D.P. Levy, E. Gainer, H.B. Croxatto. 2010. Immediate pre-ovulatory administration of 30 mg ulipristal acetate significantly delays follicular rupture. *Hum Reprod*. 25:2256–2263.
- Brar, A.K., S. Handwerger, C.A. Kessler, B.J. Aronow. 2001. Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol. Genomics*. 7:135–148.
- Bubb, M.R., A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, K.L. Duncan, E.D. Korn. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem*. 269:14869–71.
- Burkart, A.D., B. Xiong, B. Baibakov, M. Jiménez-Movilla, J. Dean. 2012. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J. Cell Biol*. 197:37–44.
- Buschiazzo, J., C. Ialy-Radio, J. Auer, J.-P. Wolf, C. Serres, B. Lefèvre, A. Ziyat. 2013. Cholesterol Depletion Disorganizes Oocyte Membrane Rafts Altering Mouse Fertilization. *PLoS One*. 8:e62919.
- Bylander, A., L. Gunnarsson, R. Shao, H. Billig, D.J. Larsson. 2015. Progesterone-mediated effects on gene expression and oocyte-cumulus complex transport in the mouse fallopian tube. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 13:40.
- Bylander, A., K. Lind, M. Goksör, H. Billig, D.J. Larsson. 2013. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 11:33.
- Bylander, A., M. Nutu, R. Wellander, M. Goksör, H. Billig, D.G.J. Larsson. 2010. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 8:48.
- Caligioni, C.S. 2009. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Curr. Protoc. Neurosci*. Appendix 4:Appendix 4I.
- Cappa, A.I., M. de Paola, P. Wetten, G.A. De Blas, M.A. Michaut. 2018. Live imaging of cortical granule exocytosis reveals that *in vitro* matured mouse oocytes are not fully competent to secrete their content. *Biol. Open*. 7:bio031872.
- Cárdenas, A.M., F.D. Marengo. 2016. How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *J. Neurochem*. 137:867–879.
- Carroll, J. 2000. Na⁺-Ca²⁺ exchange in mouse oocytes: modifications in the regulation of intracellular free Ca²⁺ during oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil*. 118:337–42.
- Carvacho, I., H.C. Lee, R.A. Fissore, D.E. Clapham. 2013. TRPV3 channels mediate strontium-induced mouse-egg activation. *Cell Rep*. 5:1375–86.
- Chabbert-Buffet, N., G. Meduri, P. Bouchard, I.M. Spitz. 2005. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Updat*. 11:293–307.
- Chaigne, A., C. Campillo, N.S. Gov, R. Voituriez, J. Azoury, C. Umaña-Díaz, M. Almonacid, I. Queguiner, P.

- Nassoy, C. Sykes, M.-H. Verlhac, M.-E. Terret. 2013. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* 15:958–966.
- Chaigne, A., C. Campillo, N.S. Gov, R. Voituriez, C. Sykes, M.H. Verlhac, M.E. Terret. 2015. A narrow window of cortical tension guides asymmetric spindle positioning in the mouse oocyte. *Nat. Commun.* 6:6027.
- Chaigne, A., C. Campillo, R. Voituriez, N.S. Gov, C. Sykes, M.-H. Verlhac, M.-E. Terret. 2016. F-actin mechanics control spindle centring in the mouse zygote. *Nat. Commun.* 7:10253.
- Chanaday, N.L., E.T. Kavalali. 2018. Time course and temperature dependence of synaptic vesicle endocytosis. *FEBS Lett.* 592:3606–3614.
- Chandra, A., C.E. Copen, E.H. Stephen. 2014. Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010. *Natl. Health Stat. Report.* 1–21.
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* 168:697–8.
- Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J.L. Lewis, I. Torres. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86:679–88.
- Cheek, T.R., O.M. McGuinness, C. Vincent, R.B. Moreton, M.J. Berridge, M.H. Johnson. 1993. Fertilisation and thimerosal stimulate similar calcium spiking patterns in mouse oocytes but by separate mechanisms. *Development.* 119:179–89.
- Cheon, B., H.-C. Lee, T. Wakai, R.A. Fissore. 2013. Ca²⁺ influx and the store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation. *Mol. Biol. Cell.* 24:1396–410.
- Choi, T., K. Fukasawa, R. Zhou, L. Tessarollo, K. Borror, J. Resau, G.F. Vande Woude. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:7032–5.
- Chung, J.J., S.H. Shim, R.A. Everley, S.P. Gygi, X. Zhuang, D.E. Clapham. 2014. Structurally distinct Ca(2+) signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell.* 157:808–822.
- Clapham, D.E. 2007. Calcium Signaling. *Cell.* 131:1047–1058.
- Cohen, A.M., S.C. Liu, L.H. Derick, J. Palek. 1986. Ultrastructural studies of the interaction of spectrin with phosphatidylserine liposomes. *Blood.* 68:920–6.
- Cold Spring Harbor. 2009. Whitten's/HEPES/PVA. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009:pdb.rec11629-pdb.rec11629.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473–8.
- Cooper, T.G. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53:119–36.
- Covian-Nares, J.F., R.M. Smith, S.S. Vogel. 2008. Two independent forms of endocytosis maintain embryonic cell surface homeostasis during early development. *Dev. Biol.* 316:135–148.
- Cowell, I.G., R. Aucott, S.K. Mahadevaiah, P.S. Burgoyne, N. Huskisson, S. Bongiorno, G. Prantera, L. Fanti, S. Pimpinelli, R. Wu, D.M. Gilbert, W. Shi, R. Fundele, H. Morrison, P. Jeppesen, P.B. Singh. 2002. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma.* 111:22–36.
- Coy, P., F.A. García-Vázquez, P.E. Visconti, M. Avilés. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction.* 144:649–660.
- Crane, L.H., L. Martin. 1991. Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy. *Reprod. Fertil. Dev.* 3:685–98.

- Curia, C. 2011. Tesis de Licenciatura: Movilización de fosfatidilserina en la membrana de ovocitos fertilizados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Cuthbertson, K.S., D.G. Whittingham, P.H. Cobbold. 1981. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature*. 294:754–7.
- Daleke, D.L., J. V Lyles. 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1486:108–27.
- Damatta, R.A., S.H. Seabra, P. Deolindo, A.C. V Arnholdt, L. Manhães, S. Goldenberg, W. de Souza. 2007. Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 266:29–33.
- Da Ros, V.G., J.A. Maldera, W.D. Willis, D.J. Cohen, E.H. Goulding, D.M. Gelman, M. Rubinstein, E.M. Eddy, P.S. Cuasnicu. 2008. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol.* 320:12–18.
- Da Ros, V.G., M.W. Muñoz, M.A. Battistone, N.G. Brukman, G. Carvajal, L. Curci, M.D. Gómez-Ellas, D.B.J. Cohen, P.S. Cuasnicu. 2015. From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammalian fertilization. *Asian J. Androl.* 17:711–5.
- Darszon, A., T. Nishigaki, C. Beltran, C.L. Treviño. 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91:1305–1355.
- Das, M., B. Xu, L. Lin, S. Chakrabarti, V. Shivaswamy, N.S. Rote. 2004. Phosphatidylserine Efflux and Intercellular Fusion in a BeWo Model of Human Villous Cytotrophoblast. *Placenta*. 25:396–407.
- Deb, K., J. Reese, B.C. Paria. 2006. Methodologies to study implantation in mice. *Methods Mol. Med.* 121:9–34.
- De Craene, J.-O., D. Bertazzi, S. Bär, S. Friant. 2017. Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18:634.
- de Freitas Balanco, J.M., M.E. Moreira, A. Bonomo, P.T. Bozza, G. Amarante-Mendes, C. Pirmez, M.A. Barcinski. 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* 11:1870–3.
- Deguchi, R., H. Shirakawa, S. Oda, T. Mohri, S. Miyazaki. 2000. Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev. Biol.* 218:299–313.
- De Milliano, I., D. Van Hattum, J.C.F. Ket, J.A.F. Huirne, W.J.K. Hehenkamp. 2017. Endometrial changes during ulipristal acetate use: A systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 214:56–64.
- De Paola, M., O.D. Bello, M.A. Michaut. 2015. Cortical Granule Exocytosis Is Mediated by Alpha-SNAP and N-Ethylmaleimide Sensitive Factor in Mouse Oocytes. *PLoS One*. 10:e0135679.
- De Vries, K.J., T. Wiedmer, P.J. Sims, B.M. Gadella. 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol. Reprod.* 68:2122–34.
- De Young, G.W., J. Keizer. 1992. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:9895–9.
- Díaz-Gimeno, P., M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, N. Bosch, J.A. Martínez-Conejero, P. Alamá, N. Garrido, A. Pellicer, C. Simón. 2013. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil. Steril.* 99:508–17.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum. Reprod. Update.* 2:29–42.

- Ducibella, T., E. Anderson, D.F. Albertini, J. Aalberg, S. Rangarajan. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 130:184–97.
- Ducibella, T., P. Duffy, J. Buetow. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol. Reprod.* 50:467–73.
- Ducibella, T., R. Fissore. 2008. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.* 315:257–79.
- Ducibella, T., D. Huneau, E. Angelichio, Z. Xu, R.M. Schultz, G.S. Kopf, R. Fissore, S. Madoux, J.-P. Ozil. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. *Dev. Biol.* 250:280–91.
- Ducibella, T., L. LeFevre. 1997. Study of protein kinase C antagonists on cortical granule exocytosis and cell-cycle resumption in fertilized mouse eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 46:216–26.
- Ducibella, T., R. Schultz, J. Ozil. 2006. Role of calcium signals in early development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17:324–332.
- Dumollard, R., M. Duchen, C. Sardet. 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17:314–323.
- Dumollard, R., P. Marangos, G. Fitzharris, K. Swann, M. Duchen, J. Carroll. 2004. Sperm-triggered [Ca²⁺] oscillations and Ca²⁺ homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development.* 131:3057–3067.
- Duncan, F.E., E.L. Que, N. Zhang, E.C. Feinberg, T. V. O'Halloran, T.K. Woodruff. 2016. The zinc spark is an inorganic signature of human egg activation. *Sci. Rep.* 6:24737.
- Dupont, G., R. Dumollard. 2004. Simulation of calcium waves in ascidian eggs: insights into the origin of the pacemaker sites and the possible nature of the sperm factor. *J. Cell Sci.* 117:4313–23.
- Dupré, A., O. Haccard, C. Jessus. 2011. Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. *J. Signal Transduct.* 2011:350412.
- Ebensperger, C., C. Barros. 1984. Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res.* 9:387–397.
- Ebner, T., M. Montag, M. Montag, K. Van der Ven, H. Van der Ven, T. Ebner, O. Shebl, P. Oppelt, J. Hirchenhain, J. Krüssel, B. Maxrath, C. Gnoth, K. Friol, J. Tigges, E. Wünsch, J. Luckhaus, A. Beerkotte, D. Weiss, K. Grunwald, D. Struller, C. Etien. 2015. Live birth after artificial oocyte activation using a ready-to-use ionophore: a prospective multicentre study. *Reprod. Biomed. Online.* 30:359–365.
- Eddy, E.M., D.A. O'Brien. 1994. The spermatozoon. *Physiol. Reprod.* 29–78.
- Edwards, R.G., J.M. Purdy, P.C. Steptoe, D.E. Walters. 1981. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141:408–16.
- Eliyahu, E., R. Shalgi. 2002. A role for protein kinase C during rat egg activation. *Biol. Reprod.* 67:189–95.
- Eliyahu, E., N. Shtraizent, A. Tsaadon, R. Shalgi. 2006. Association between myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) translocation and cortical granule exocytosis in rat eggs. *Reproduction.* 131:221–231.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495–516.
- Enders, A.C., S. Schlafke. 1967. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am. J. Anat.* 120:185–225.

- Erbach, G.T., J.A. Lawitts, V.E. Papaioannou, J.D. Biggers. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod.* 50:1027–1033.
- Ernesto, J.I., M. Weigel Muñoz, M.A. Battistone, G. Vasen, P. Martínez-López, G. Orta, D. Figueiras-Fierro, J.L. De la Vega-Beltran, I.A. Moreno, H.A. Guidobaldi, L. Giojalas, A. Darszon, D.J. Cohen, P.S. Cuasnicú. 2015. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J. Cell Biol.* 210:1213–24.
- Esber, N., F. Le Billan, M. Resche-Rigon, H. Loosfelt, M. Lombès, N. Chabbert-Buffet. 2015. Ulipristal Acetate Inhibits Progesterone Receptor Isoform A-Mediated Human Breast Cancer Proliferation and BCL2-L1 Expression. *PLoS One.* 10:e0140795.
- Escoffier, J., H.C. Lee, S. Yassine, R. Zouari, G. Martinez, T. Karaouzène, C. Coutton, Z. Kherraf, L. Halouani, C. Triki, S. Nef, N. Thierry-Mieg, S.N. Savinov, R. Fissore, P.F. Ray, C. Arnoult. 2016. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Hum. Mol. Genet.* 25:878–891.
- ESHRE. 2014. ART Fact Sheet (June 2014).
- Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, P.M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148:2207–16.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* 78:203–16.
- Fairn, G.D., S. Grinstein. 2008. Cell biology. A one-sided signal. *Science.* 320:458–60.
- Ferenczy, A., L.C. Giudice. 1996. The endometrial cycle: morphologic and biochemical events. *Reprod. Endocrinol. Surgery, Technol.* 171–194.
- Ferreira, E.M., A.A. Vireque, P.R. Adona, F.V. Meirelles, R.A. Ferriani, P.A.A.S. Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 71:836–848.
- Fidler, A.T., J. Bernstein. 1999. Infertility: from a personal to a public health problem. *Public Health Rep.* 114:494–511.
- Fine, P., H. Mathé, S. Ginde, V. Cullins, J. Morfesis, E. Gainer. 2010. Ulipristal Acetate Taken 48–120 Hours After Intercourse for Emergency Contraception. *Obstet. Gynecol.* 115:257–263.
- Fischer, K., S. Voelkl, J. Berger, R. Andreesen, T. Pomorski, A. Mackensen. 2006. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood.* 108:4094–4101.
- Fissore, R.A., C. Pinto-Correia, J.M. Robl. 1995. Inositol trisphosphate-induced calcium release in the generation of calcium oscillations in bovine eggs. *Biol. Reprod.* 53:766–74.
- FitzHarris, G., P. Marangos, J. Carroll. 2003. Cell Cycle-dependent Regulation of Structure of Endoplasmic Reticulum and Inositol 1,4,5-Trisphosphate-induced Ca²⁺ Release in Mouse Oocytes and Embryos. *Mol. Biol. Cell.* 14:288–301.
- Flaherty, S.P., D. Payne, C.D. Matthews. 1998. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 13 Suppl 1:155–64.
- Fléchon, J.-E. 2016. The acrosome of eutherian mammals. *Cell Tissue Res.* 363:147–57.
- Florman, H.M., R.A. Fissore. 2015. Fertilization in Mammals. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 149–196.
- Forrester, J.S., S.B. Milne, P.T. Ivanova, H.A. Brown. 2004. Computational Lipidomics: A Multiplexed Analysis of Dynamic Changes in Membrane Lipid Composition during Signal Transduction. *Mol. Pharmacol.*

- 65:813–821.
- Fraser, L.R., L.M. Drury. 1975. The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol Reprod.* 13:513–518.
- Fujimoto, S., N. Yoshida, T. Fukui, M. Amanai, T. Isobe, C. Itagaki, T. Izumi, A.C.F. Perry. 2004. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev. Biol.* 274:370–383.
- Gaddum-Rosse, P. 1985. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am. J. Anat.* 174:347–56.
- Gadella, B.M., R.A. Harrison. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127:2407–20.
- Gadella, B.M., R.A.P. Harrison. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol. Reprod.* 350:340–350.
- Gaffet, P., F. Bassé, A. Bienvenüe. 1994. Loss of phospholipid asymmetry in human platelet plasma membrane after 1-12 days of storage. An ESR study. *Eur. J. Biochem.* 222:1033–40.
- Garcia, E., P. Bouchard, J. De Brux, J. Berdah, R. Frydman, G. Schaison, E. Milgrom, M. Perrot-Applanat. 1988. Use of Immunocytochemistry of Progesterone and Estrogen Receptors for Endometrial Dating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:80–87.
- Gardiner, D.M., R.D. Grey. 1983. Membrane junctions in *Xenopus* eggs: their distribution suggests a role in calcium regulation. *J. Cell Biol.* 96:1159–63.
- Gardner, A.J., J.P. Evans. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 18:53–61.
- Garrido-Gómez, T., M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, P. Diaz-Gimeno, F. Vilella, C. Simón. 2013. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil. Steril.* 99:1078–1085.
- Gemzell-Danielsson, K., C. Berger, P.G. Lalitkumar. 2014. Mechanisms of action of oral emergency contraception. *Gynecol. Endocrinol.* 30:685–687.
- Gemzell-Danielsson, K., C.X. Meng. 2010. Emergency contraception: potential role of ulipristal acetate. *Int J Womens Heal.* 2:53–61.
- Gemzell-Danielsson, K., J. Trussell. 2013. UPA & LNG, but Not Good Enough. *Contraception.* 88:585–586.
- Giudice, L.C. 2004. Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *Am. J. Pharmacogenomics.* 4:299–312.
- Glasier, A.F., S.T. Cameron, P.M. Fine, S.J. Logan, W. Casale, J. Van Horn, L. Sogor, D.L. Blithe, B. Scherrer, H. Mathe, A. Jaspart, A. Ulmann, E. Gainer. 2010. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet.* 375:555–562.
- Greenwald, G.S., I. Rothchild. 1968. Formation and maintenance of corpora lutea in laboratory animals. *J. Anim. Sci.* 27 Suppl 1:139–62.
- Guérin, P., S. El Mouatassim, Y. Ménézo. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 7:175–89.
- Guidobaldi, H.A., M. Cubilla, A. Moreno, M.V. Molino, L. Bahamondes, L.C. Giojalas. 2017. Sperm chemorepulsion, a supplementary mechanism to regulate fertilization. *Hum. Reprod.* 32:1560–1573.
- Guidobaldi, H.A., M.E. Teves, D.R. Unates, L.C. Giojalas, D.R. Uñates, L.C. Giojalas. 2012. Sperm transport and

- retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*. 143:587–596.
- Gundelfinger, E.D., M.M. Kessels, B. Qualmann. 2003. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:127–139.
- Gupta, S.K., B. Bhandari. 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J. Androl.* 13:97–105.
- Hachem, A., J. Godwin, M. Ruas, H.C. Lee, M. Ferrer Buitrago, G. Ardestani, A. Bassett, S. Fox, F. Navarrete, P. de Sutter, B. Heindryckx, R. Fissore, J. Parrington. 2017. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development*. 144:2914–2924.
- Halet, G. 2004. PKC signaling at fertilization in mammalian eggs. *Biochim. Biophys. Acta*. 1742:185–9.
- Han, Y.-E., J.N. Chun, M.J. Kwon, Y.-S. Ji, M.-H. Jeong, H.-H. Kim, S.-H. Park, J.C. Rah, J.-S. Kang, S.-H. Lee, W.-K. Ho. 2018. Endocytosis of K ATP Channels Drives Glucose-Stimulated Excitation of Pancreatic β Cells. *Cell Rep*. 22:471–481.
- Hansen, D. V., J.J. Tung, P.K. Jackson. 2006. CaMKII and Polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:608–613.
- Harlow, G.M., P. Quinn. 1982. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:187–93.
- Heindryckx, B., J. Van der Elst, P. De Sutter, M. Dhont. 2005. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum. Reprod.* 20:2237–41.
- Heindryckx, B., S. De Gheselle, J. Gerris, M. Dhont, P. De Sutter. 2008. Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Biomed. Online*. 17:662–8.
- Hess, A., N. Nayak, L. Giudice. 2006. Oviduct and Endometrium: Cyclic Changes in the Primate Oviduct and Endometrium. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 337–381.
- Heytens, E., J. Parrington, K. Coward, C. Young, S. Lambrecht, S.-Y. Yoon, R.A. Fissore, R. Hamer, C.M. Deane, M. Ruas, P. Grasa, R. Soleimani, C.A. Cuvelier, J. Gerris, M. Dhont, D. Deforce, L. Leybaert, P. De Sutter. 2009. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.* 24:2417–28.
- Hild, S.A., J.R. Reel, L.H. Hoffman, R.P. Blye. 2000. CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits. *Hum. Reprod.* 15:822–9.
- Hildebrand, M.S., M.R. Avenarius, M. Fellous, Y. Zhang, N.C. Meyer, J. Auer, C. Serres, K. Kahrizi, H. Najmabadi, J.S. Beckmann, R.J.H. Smith. 2010. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur. J. Hum. Genet.* 18:1178–1184.
- Hinrichsen, M.J., J.A. Blaquier. 1980. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 60:291–4.
- Hinze, C., E. Boucrot. 2018. Local actin polymerization during endocytic carrier formation. *Biochem. Soc. Trans.* 46:565–576.
- Ho, H.C., S.S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122:519–26.
- Holroyd, P., T. Lang, D. Wenzel, P. De Camilli, R. Jahn. 2002. Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 99:16806–11.
- Holt, W. V., A. Fazeli. 2015. Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 21:491–501.
- Holt, W. V., A. Fazeli. 2010. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol Reprod Dev.* 77:934–943.
- Hoodbhoy, T., J. Dean. 2004. Insights into the molecular basis of sperm–egg recognition in mammals. *Reproduction.* 127:417–422.
- Hoodbhoy, T., P. Talbot. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol. Reprod. Dev.* 39:439–48.
- Houlston, E., B. Maro. 1989. Posttranslational modification of distinct microtubule subpopulations during cell polarization and differentiation in the mouse preimplantation embryo. *J. Cell Biol.* 108:543–51.
- Hu, S., G. Yao, Y. Wang, H. Xu, X. Ji, Y. He, Q. Zhu, Z. Chen, Y. Sun. 2014. Transcriptomic Changes During the Pre-Receptive to Receptive Transition in Human Endometrium Detected by RNA-Seq. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99:E2744–E2753.
- Hunter, R.H. 1996. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 44:417–22.
- Igarashi, M., M. Watanabe. 2007. Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci. Res.* 58:226–233.
- Igusa, Y., S. Miyazaki, N. Yamashita. 1983. Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. *J. Physiol.* 340:633–47.
- Ikebuchi, Y., N. Masumoto, T. Matsuoka, T. Yokoi, M. Tahara, K. Tasaka, A. Miyake, Y. Murata. 1998. SNAP-25 is essential for cortical granule exocytosis in mouse eggs. *Am. J. Physiol.* 274:C1496–500.
- Inoue, N., M. Ikawa, A. Isotani, M. Okabe. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434:234–238.
- Ito, J., N. Kashiwazaki. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Anim. Sci. J.* 83:669–82.
- Ivankin, A., I. Kuzmenko, D. Gidalevitz. 2012. Cholesterol Mediates Membrane Curvature during Fusion Events. *Phys. Rev. Lett.* 108:238103.
- Iwahashi, K., N. Kuji, T. Fujiwara, H. Tanaka, J. Takahashi, N. Inagaki, S. Komatsu, A. Yamamoto, Y. Yoshimura, K. Akagawa. 2003. Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes. *Reproduction.* 126:73–81.
- Iwai, M., Y. Harada, R. Miyabayashi, W. Kang, A. Nakamura, N. Kawano, Y. Miyamoto, M. Yamada, T. Hamatani, M. Miyado, K. Yoshida, H. Saito, M. Tanaka, A. Umezawa, K. Miyado. 2018. Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice. *Heliyon.* 4:e00944.
- Jaffe, L.A., N.L. Cross. 1984. Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. *Biol. Reprod.* 30:50–4.
- Jankovičová, J., M. Simon, J. Antalíková, P. Cupperová, K. Michalková. 2015. Role of tetraspanin CD9 molecule in fertilization of mammals. *Physiol. Res.* 64:279–93.
- Jégou, A., A. Ziyat, V. Barraud-Lange, E. Perez, J.P. Wolf, F. Pincet, C. Gourier. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:10946–51.
- Jellerette, T., C.L. He, H. Wu, J.B. Parys, R.A. Fissore. 2000. Down-regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate

- receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev. Biol.* 223:238–50.
- Jesam, C., L. Cochon, A.M. Salvatierra, A. Williams, N. Kapp, D. Levy-Gompel, V. Brache. 2016. A prospective, open-label, multicenter study to assess the pharmacodynamics and safety of repeated use of 30 mg ulipristal acetate. *Contraception*. 93:310–316.
- Jílek, F., R. Hüttelová, J. Petr, M. Holubová, J. Rozinek. 2000. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Anim. Reprod. Sci.* 63:101–11.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S.A. Baba, K. Chiba, N. Hirohashi. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:4892–4896.
- Johnson, J.E., M.L. Zimmerman, D.L. Daleke, A.C. Newton. 1998a. Lipid Structure and Not Membrane Structure Is the Major Determinant in the Regulation of Protein Kinase C by Phosphatidylserine [†]. *Biochemistry*. 37:12020–12025.
- Johnson, M.H. 1975. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 44:167–84.
- Johnson, M.H., B. Maro. 1984. The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82:97–117.
- Johnson, M.H., C.A. Ziomek. 1981. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J. Cell Biol.* 91:303–8.
- Johnson, R.P., V. Niggli, P. Durrer, S.W. Craig. 1998b. A Conserved Motif in the Tail Domain of Vinculin Mediates Association with and Insertion into Acidic Phospholipid Bilayers [†]. *Biochemistry*. 37:10211–10222.
- Jones, K.T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130:813–823.
- Jones, K.T. 2007. Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34:1084–1089.
- Kaibuchi, K., Y. Fukumoto, N. Oku, Y. Takai, K. Arai, M. Muramatsu. 1989. Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264:13489–96.
- Kaji, K., S. Oda, T. Shikano, T. Ohnuki, Y. Uematsu, J. Sakagami, N. Tada, S. Miyazaki, A. Kudo. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24:279–282.
- Kato, N., M. Nakanishi, N. Hirashima. 2002. Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. *Biochemistry*. 41:8068–74.
- Kawano, N., N. Araki, K. Yoshida, T. Hibino, N. Ohnami, M. Makino, S. Kanai, H. Hasuwa, M. Yoshida, K. Miyado, A. Umezawa. 2014. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:4145–4150.
- Kesseru, E., P. Camacho-Ortega, G. Laudahn, G. Schopflin. 1975. In vitro action of progestogens on sperm migration in human cervical mucus. *Fertil Steril.* 26:57–61.
- Kettle, E., S.L. Page, G.P. Morgan, C.S. Malladi, C.L. Wong, R.A. Boadle, B.J. Marsh, P.J. Robinson, M. Chircop. 2015. A Cholesterol-Dependent Endocytic Mechanism Generates Midbody Tubules During Cytokinesis. *Traffic*. 16:1174–92.
- Kidder, G.M., J.R. McLachlin. 1985. Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 112:265–75.
- Kim, A.M., M.L. Bernhardt, B.Y. Kong, R.W. Ahn, S. Vogt, T.K. Woodruff, T. V. O'Halloran. 2011. Zinc Sparks

- Are Triggered by Fertilization and Facilitate Cell Cycle Resumption in Mammalian Eggs. *ACS Chem. Biol.* 6:716–723.
- Kim, E., D. Baba, M. Kimura, M. Yamashita, S. -i. Kashiwabara, T. Baba. 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:18028–18033.
- Kiss, A.L., E. Botos. 2009. Endocytosis *via* caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J. Cell. Mol. Med.* 13:1228–1237.
- Kline, D., J.T. Kline. 1992a. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149:80–9.
- Kline, D., J.T. Kline. 1992b. Thapsigargin activates a calcium influx pathway in the unfertilized mouse egg and suppresses repetitive calcium transients in the fertilized egg. *J. Biol. Chem.* 267:17624–30.
- Kline, D., J. Stewart-Savage. 1994. The Timing of Cortical Granule Fusion, Content Dispersal, and Endocytosis during Fertilization of the Hamster Egg: An Electrophysiological and Histochemical Study. *Dev. Biol.* 162:277–287.
- Ko, J.K.Y., V.W. Huang, R.H.W. Li, W.S.B. Yeung, P.C. Ho, P.C.N. Chiu. 2014. An in vitro study of the effect of mifepristone and ulipristal acetate on human sperm functions. *Andrology.* 2:868–874.
- Kouchi, Z., K. Fukami, T. Shikano, S. Oda, Y. Nakamura, T. Takenawa, S. Miyazaki. 2004. Recombinant Phospholipase C ζ Has High Ca²⁺ Sensitivity and Induces Ca²⁺ Oscillations in Mouse Eggs. *J. Biol. Chem.* 279:10408–10412.
- Kouchi, Z., T. Shikano, Y. Nakamura, H. Shirakawa, K. Fukami, S. Miyazaki. 2005. The Role of EF-hand Domains and C2 Domain in Regulation of Enzymatic Activity of Phospholipase C ζ . *J. Biol. Chem.* 280:21015–21021.
- Kunzelmann-Marche, C., J.-M. Freyssinet, M.C. Martínez. 2001. Regulation of Phosphatidylserine Transbilayer Redistribution by Store-operated Ca²⁺ Entry. *J. Biol. Chem.* 276:5134–5139.
- Lalitkumar, P.G.L., S. Lalitkumar, C.X. Meng, A. Stavreus-Evers, F. Hambiliki, U. Bentin-Ley, K. Gemzell-Danielsson. 2007. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum. Reprod.* 22:3031–3037.
- Lamaze, C., S.L. Schmid. 1995. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:573–80.
- La Spina, F.A., L.C. Puga Molina, A. Romarowski, A.M. Vitale, T.L. Falzone, D. Krapf, N. Hirohashi, M.G. Buffone. 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol.* 411:172–182.
- Lawrence, Y., M. Whitaker, K. Swann. 1997. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development.* 124:233–41.
- Lee, B., S.-Y. Yoon, C. Malcuit, J.B. Parys, R.A. Fissore. 2010. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 degradation in mouse eggs and impact on [Ca²⁺]_i oscillations. *J. Cell. Physiol.* 222:238–247.
- Lee, D., N. Hirashima, Y. Kirino. 2000. Rapid transbilayer phospholipid redistribution associated with exocytotic release of neurotransmitters from cholinergic nerve terminals isolated from electric ray *Narke japonica*. *Neurosci. Lett.* 291:21–4.
- Lee, E., P. De Camilli. 2002. Dynamin at actin tails. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:161–166.
- Lee, H.C., S.-Y. Yoon, K. Lykke-Hartmann, R.A. Fissore, I. Carvacho. 2016. TRPV3 channels mediate Ca²⁺ influx induced by 2-APB in mouse eggs. *Cell Calcium.* 59:21–31.

- Lefièvre, L., S.J. Conner, A. Salpekar, O. Olufowobi, P. Ashton, B. Pavlovic, W. Lenton, M. Afnan, I.A. Brewis, M. Monk, D.C. Hughes, C.L.R. Barratt. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 19:1580–6.
- Leguia, M., S. Conner, L. Berg, G.M. Wessel. 2006. Synaptotagmin I is involved in the regulation of cortical granule exocytosis in the sea urchin. *Mol. Reprod. Dev.* 73:895–905.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 287:319–21.
- Lenoir, G., P. Williamson, J.C.M. Holthuis. 2007. On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11:654–61.
- Lessey, B.A., A.P. Killam, D.A. Metzger, A.F. Haney, G.L. Greene, K.S. McCarty. 1988. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:334–40.
- Levens, E.D., C. Potlog-Nahari, A.Y. Armstrong, R. Wesley, A. Premkumar, D.L. Blithe, W. Blocker, L.K. Nieman. 2008. CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 111:1129–36.
- Leventis, P.A., S. Grinstein. 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39:407–27.
- Levy, D.P., M. Jager, N. Kapp, J.-L. Abitbol. 2014. Ulipristal acetate for emergency contraception: postmarketing experience after use by more than 1 million women. *Contraception.* 89:431–433.
- Levy, J.B., M.H. Johnson, H. Goodall, B. Maro. 1986. The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 95:213–37.
- Li, H.W.R., Y.X. Li, T.T. Li, H. Fan, E.H.Y. Ng, W.S.B. Yeung, P.C. Ho, K.F. Lee. 2017. Effect of ulipristal acetate and mifepristone at emergency contraception dose on the embryo-endometrial attachment using an in vitro human trophoblastic spheroid and endometrial cell co-culture model. *Hum. Reprod.* 32:2414–2422.
- Li, H.W.R., S.B. Liao, W.S. Yeung, E.H. Ng, W.S. O, P.C. Ho. 2014. Ulipristal acetate resembles mifepristone in modulating human fallopian tube function. *Hum Reprod.* 29:2156–2162.
- Libersky, E.A., D.E. Boatman. 1995. Effects of progesterone on in vitro sperm capacitation and egg penetration in the golden hamster. *Biol Reprod.* 53:483–487.
- Lira-Albarrán, S., M. Durand, D. Barrera, C. Vega, R.G. Becerra, L. Díaz, J. García-Quiroz, C. Rangel, F. Larrea. 2018. A single preovulatory administration of ulipristal acetate affects the decidualization process of the human endometrium during the receptive period of the menstrual cycle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29709683>.
- Lira-Albarrán, S., M. Durand, M.F. Larrea-Schiavon, L. González, D. Barrera, C. Vega, A. Gamboa-Domínguez, C. Rangel, F. Larrea. 2017. Ulipristal acetate administration at mid-cycle changes gene expression profiling of endometrial biopsies taken during the receptive period of the human menstrual cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 447:1–11.
- Lishko, P. V, I.L. Botchkina, Y. Kirichok. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 471:387–391.
- Liu, J.P. 1997. Protein phosphorylation events in exocytosis and endocytosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24:611–8.
- Liu, L., J.R. Trimarchi, D.L. Keefe. 2002. Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biol. Reprod.* 66:204–10.

- Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:149.
- Liu, X.-Y., S.-F. Mal, D.-Q. Miao, D.-J. Liu, S. Bao, J.-H. Tan. 2005. Cortical granules behave differently in mouse oocytes matured under different conditions. *Hum. Reprod.* 20:3402–3413.
- Longo, F.J. 1973. Fertilization: a comparative ultrastructural review. *Biol. Reprod.* 9:149–215.
- Longo, F.J. 1987. Actin-plasma membrane associations in mouse eggs and oocytes. *J. Exp. Zool.* 243:299–309.
- Longo, F.J., D.Y. Chen. 1984. Development of surface polarity in mouse eggs. *Scan. Electron Microsc.* 703–16.
- Lorenzo, F., M. Tiverón, M. Guidobono, M. Villamayor, E. Obejero Young. 2011. Embarazo posterior a activación ovocitaria con ionóforo de calcio en pacientes con antecedente de falla completa de fertilización post-ICSI. Presentación de dos casos. *Reproduccion.* 108–110.
- Louis, J.F., M.E. Thoma, D.N. Sørensen, A.C. McLain, R.B. King, R. Sundaram, N. Keiding, G.M. Buck Louis. 2013. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology.* 1:741–748.
- Loutradis, D., E. Kiapekou, E. Zapanti, A. Antsaklis. 2006. Oocyte Maturation in Assisted Reproductive Techniques. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092:235–246.
- Lowther, K.M., V.O. Nikolaev, L.M. Mehlmann. 2011. Endocytosis in the mouse oocyte and its contribution to cAMP signaling during meiotic arrest. *Reproduction.* 141:737–747.
- Lu, A., C.-J. Zhou, D.-H. Wang, Z. Han, X.-W. Kong, Y.-Z. Ma, Z.-Z. Yun, C.-G. Liang. 2017. Cytoskeleton-associated protein 5 and clathrin heavy chain binding regulates spindle assembly in mouse oocytes. *Oncotarget.* 8:17491–17503.
- Lyons, R.A., E. Saridogan, O. Djahanbakhch. 2006. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum. Reprod. Update.* 12:363–372.
- Machaty, Z. 2016. Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization. *Cell Tissue Res.* 363:169–183.
- Machaty, Z., A.R. Miller, L. Zhang. 2017. Egg Activation at Fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 953:1–47.
- Macháty, Z., J.J. Ramsoondar, A.J. Bonk, K.R. Bondioli, R.S. Prather. 2002. Capacitative calcium entry mechanism in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 66:667–74.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, T. Kirchhausen. 2006. Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Dev. Cell.* 10:839–850.
- Madgwick, S., K.T. Jones. 2007. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Div.* 2:4.
- Mahmood, T., E. Saridogan, S. Smutna, A.M. Habib, O. Djahanbakhch. 1998. The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Hum. Reprod.* 13:2991–4.
- Mahutte, N.G., A. Arici. 2003. Failed fertilization: is it predictable? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 15:211–8.
- Makuch, R., A. Zasada, K. Mabuchi, K. Krauze, C.L. Wang, R. Dabrowska. 1997. Phosphatidylserine liposomes can be tethered by caldesmon to actin filaments. *Biophys. J.* 73:1607–16.
- Maleszewski, M., Y. Kimura, R. Yanagimachi. 1996. Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to the oolemma block to sperm penetration: Evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 44:256–259.
- Mangal, R.K., R.D. Wiehle, A.N. Poindexter, N.L. Weigel. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63:195–202.

- Mangoli, V., S. Dandekar, S. Desai, R. Mangoli. 2008. The outcome of ART in males with impaired spermatogenesis. *J. Hum. Reprod. Sci.* 1:73–6.
- Mann, M.R.W., M.S. Bartolomei. 2002. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol.* 3:REVIEWS1003.
- Marangos, P., G. FitzHarris, J. Carroll. 2003. Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development.* 130:1461–72.
- Maro, B., S.K. Howlett, E. Houlston. 1986. Cytoskeletal dynamics in the mouse egg. *J. Cell Sci. Suppl.* 5:343–59.
- Maro, B., M.H. Johnson, S.J. Pickering, G. Flach. 1984. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 81:211–37.
- Maro, B., M.H. Johnson, S.J. Pickering, D. Louvard. 1985. Changes in the distribution of membranous organelles during mouse early development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90:287–309.
- Maro, B., J. Kubiak, C. Gueth, H. De Pennart, E. Houlston, M. Weber, C. Antony, J. Aghion. 1990. Cytoskeleton organization during oogenesis, fertilization and preimplantation development of the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 34:127–37.
- Martín-Romero, F.J., J.R. Ortíz-de-Galisteo, J. Lara-Laranjeira, J.A. Domínguez-Arroyo, E. González-Carrera, I.S. Álvarez. 2008. Store-Operated Calcium Entry in Human Oocytes and Sensitivity to Oxidative Stress1. *Biol. Reprod.* 78:307–315.
- Martin, T.F.J. 2000. Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* 2:E9–E11.
- Masumoto, N., T. Sasaki, M. Tahara, A. Mammoto, Y. Ikebuchi, K. Tasaka, M. Tokunaga, Y. Takai, A. Miyake. 1996. Involvement of Rabphilin-3A in cortical granule exocytosis in mouse eggs. *J. Cell Biol.* 135:1741–7.
- Matson, S., S. Markoulaki, T. Ducibella. 2006. Antagonists of Myosin Light Chain Kinase and of Myosin II Inhibit Specific Events of Egg Activation in Fertilized Mouse Eggs1. *Biol. Reprod.* 74:169–176.
- Mazur, E.C., M.J. Large, F.J. DeMayo. 2015. Human Oviduct and Endometrium: Changes over the Menstrual Cycle. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 1077–1097.
- McAvey, B.A., G.B. Wortzman, C.J. Williams, J.P. Evans. 2002. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol. Reprod.* 67:1342–52.
- McGuinness, O.M., R.B. Moreton, M.H. Johnson, M.J. Berridge. 1996. A direct measurement of increased divalent cation influx in fertilised mouse oocytes. *Development.* 122:2199–206.
- McLay, D.W., H.J. Clarke. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction.* 125:625–33.
- Mehlmann, L.M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction.* 130:791–799.
- Mehlmann, L.M., M. Terasaki, L.A. Jaffe, D. Kline. 1995. Reorganization of the Endoplasmic Reticulum during Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte. *Dev. Biol.* 170:607–615.
- Meng, C.-X., K.L. Andersson, U. Bentin-Ley, K. Gemzell-Danielsson, P.G.L. Lalitkumar. 2009. Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model. *Fertil. Steril.* 91:256–264.
- Mercer, J., A. Helenius. 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science.* 320:531–5.

- Merrick, B.A., S. Dhungana, J.G. Williams, J.J. Aloor, S. Peddada, K.B. Tomer, M.B. Fessler. 2011. Proteomic profiling of S-acylated macrophage proteins identifies a role for palmitoylation in mitochondrial targeting of phospholipid scramblase 3. *Mol. Cell. Proteomics*. 10:M110.006007.
- Merrifield, C.J., M.E. Feldman, L. Wan, W. Almers. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat. Cell Biol.* 4:691–698.
- Meunier, F.A., L.M. Gutiérrez. 2016. Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends Neurosci.* 39:605–613.
- Miao, Y.-L., P. Stein, W.N. Jefferson, E. Padilla-Banks, C.J. Williams. 2012. Calcium influx-mediated signaling is required for complete mouse egg activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:4169–4174.
- Michaut, M.A., C.J. Williams, R.M. Schultz. 2005. Phosphorylated MARCKS: a novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev. Biol.* 280:26–37.
- Milosevic, I. 2018. Revisiting the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in Synaptic Vesicle Recycling. *Front. Cell. Neurosci.* 12:27.
- Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe, E. Mekada. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*. 287:321–4.
- Miyado, K., K. Yoshida, K. Yamagata, K. Sakakibara, M. Okabe, X. Wang, K. Miyamoto, H. Akutsu, T. Kondo, Y. Takahashi, T. Ban, C. Ito, K. Toshimori, A. Nakamura, M. Ito, M. Miyado, E. Mekada, A. Umezawa. 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:12921–12926.
- Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12:205–16.
- Miyazaki, S., H. Shirakawa, K. Nakada, Y. Honda. 1993. Essential Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor/Ca²⁺ Release Channel in Ca²⁺ Waves and Ca²⁺ Oscillations at Fertilization of Mammalian Eggs. *Dev. Biol.* 158:62–78.
- Miyazaki, S., M. Yuzaki, K. Nakada, H. Shirakawa, S. Nakanishi, S. Nakade, K. Mikoshiba. 1992. Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*. 257:251–5.
- Montag, M., M. Köster, K. van der Ven, U. Bohlen, H. van der Ven. 2012. The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. *Reprod. Biomed. Online*. 24:521–526.
- Moos, J., Z. Xu, R.M. Schultz, G.S. Kopf. 1996. Regulation of Nuclear Envelope Assembly/Disassembly by MAP Kinase. *Dev. Biol.* 175:358–361.
- Morton, W.M., K.R. Ayscough, P.J. McLaughlin. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat. Cell Biol.* 2:376–8.
- Mote, P.A., R.L. Balleine, E.M. McGowan, C.L. Clarke. 1999. Colocalization of Progesterone Receptors A and B by Dual Immunofluorescent Histochemistry in Human Endometrium during the Menstrual Cycle ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2963–2971.
- Mozzanega, B., E. Cosmi, G.B. Nardelli. 2013. Ulipristal acetate in emergency contraception: mechanism of action. *Trends Pharmacol. Sci.* 34:195–196.
- Muguruma, M., S. Nishimuta, Y. Tomisaka, T. Ito, S. Matsumura. 1995. Organization of the functional domains in membrane cytoskeletal protein talin. *J. Biochem.* 117:1036–42.
- Mulac-Jericevic, B., J.P. Lydon, F.J. DeMayo, O.M. Conneely. 2003. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:9744–9749.

- Mulac-Jericevic, B., R.A. Mullinax, F.J. DeMayo, J.P. Lydon, O.M. Conneely. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*. 289:1751–4.
- Mulnard, J., R. Huygens. 1978. Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 44:121–31.
- Munuce, M.J., J. Cicaré, C. Zumoffen, A. Caille, S. Ghersevich, L. Bahamondes, J. Cicare, C. Zumoffen, A. Caille, S. Ghersevich, L. Bahamondes. 2013. Effects of ulipristal acetate on sperm DNA fragmentation during in vitro incubation. *Eur J Contracept Reprod Heal. Care*. 18:355–363.
- Munuce, M.J., C. Zumoffen, J. Cicare, A. Caille, S. Ghersevich, L. Bahamondes, J. Cicaré, A. Caille, S. Ghersevich, L. Bahamondes. 2012. Effect of exposure to ulipristal acetate on sperm function. *Eur J Contracept Reprod Heal. Care*. 17:428–437.
- Muro, Y., H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K. Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M. Okabe. 2016. Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol Reprod*. 94:80.
- Nagy, A., M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer. 2003. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Nallasamy, S., J. Kim, R. Sitruk-Ware, M. Bagchi, I. Bagchi. 2013. Ulipristal blocks ovulation by inhibiting progesterone receptor-dependent pathways intrinsic to the ovary. *Reprod Sci*. 20:371–381.
- Namiki, T., J. Ito, N. Kashiwazaki. 2018. Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice. *Reprod. Med. Biol.* 17:331–342.
- Nasr-Esfahani, M.H., M.R. Deemeh, M. Tavalae. 2010. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril*. 94:520–526.
- Nau, H. 1986. Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis. *Environ. Health Perspect.* 70:113–129.
- Neri, Q. V., B. Lee, Z. Rosenwaks, K. Machaca, G.D. Palermo. 2014. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*. 55:24–37.
- Niakan, K.K., J. Han, R.A. Pedersen, C. Simon, R.A.R. Pera. 2012. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 139:829–841.
- Nicolson, G.L., R. Yanagimachi, H. Yanagimachi. 1975. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zona pellucida and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell Biol.* 66:263–74.
- Nishimura, H., E. Kim, T. Nakanishi, T. Baba. 2004. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem*. 279:34957–34962.
- Niswender, G.D., J.L. Juengel, P.J. Silva, M.K. Rollyson, E.W. McIntush. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.* 80:1–29.
- Nogales, F.F., V. Crespo-Lora, N. Cruz-Viruel, C. Chamorro-Santos, C. Bergeron. 2018. Endometrial Changes in Surgical Specimens of Perimenopausal Patients Treated With Ulipristal Acetate for Uterine Leiomyomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 37:575–580.
- Nomikos, M., L.M. Blayney, M.G. Larman, K. Campbell, A. Rossbach, C.M. Saunders, K. Swann, F.A. Lai. 2005. Role of phospholipase C-zeta domains in Ca²⁺-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *J. Biol. Chem.* 280:31011–8.
- Nomikos, M., Y. Yu, K. Elgmati, M. Theodoridou, K. Campbell, V. Vassilakopoulou, C. Zikos, E. Livaniou, N. Amso, G. Nounesis, K. Swann, F.A. Lai. 2013. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 99:76–85.

- Noyes, R.W., A.T. Hertig, J. Rock. 1975. Dating the endometrial biopsy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 122:262–3.
- Nozawa, K., Y. Satouh, T. Fujimoto, A. Oji, M. Ikawa. 2018. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Sci. Rep.* 8:1315.
- Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17:3237–3245.
- O'Neill, G.T., M.H. Kaufman. 1988. Influence of postovulatory aging on chromosome segregation during the second meiotic division in mouse oocytes: A parthenogenetic analysis. *J. Exp. Zool.* 248:125–131.
- Oh, J.S., A. Susor, M. Conti. 2011. Protein tyrosine kinase Wee1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes. *Science.* 332:462–5.
- Okabe, M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development.* 140:4471–4479.
- Okabe, M. 2015. Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian J Androl.* 17:646.
- Ombelet, W., I. Cooke, S. Dyer, G. Serour, P. Devroey. 2008. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum. Reprod. Update.* 14:605–621.
- OMS. 2010. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization Press, Geneva, Switzerland.
- OMS. 2018a. Planificación familiar. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/family-planning-contraception>.
- OMS. 2018b. Anticoncepción de Urgencia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/emergency-contraception>.
- Orlandi, P.A., P.H. Fishman. 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* 141:905–15.
- Orth, J.D., E.W. Krueger, H. Cao, M.A. McNiven. 2002. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:167–72.
- Ory, S., M. Ceridono, F. Momboisse, S. Houy, S. Chasserot-Golaz, D. Heintz, V. Calco, A.-M. Haeberlé, F. a Espinoza, P.J. Sims, Y. Bailly, M.-F. Bader, S. Gasman. 2013. Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* 33:3545–56.
- Ozil, J.-P., B. Banrezes, S. Tóth, H. Pan, R.M. Schultz. 2006. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol.* 300:534–544.
- Ozil, J.-P., S. Markoulaki, S. Toth, S. Matson, B. Banrezes, J.G. Knott, R.M. Schultz, D. Huneau, T. Ducibella. 2005. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca²⁺]cyt signal in the mouse. *Dev. Biol.* 282:39–54.
- Palanisamy, G.S., Y.-P. Cheon, J. Kim, A. Kannan, Q. Li, M. Sato, S.R. Mantena, R.L. Sitruk-Ware, M.K. Bagchi, I.C. Bagchi. 2006. A Novel Pathway Involving Progesterone Receptor, Endothelin-2, and Endothelin Receptor B Controls Ovulation in Mice. *Mol. Endocrinol.* 20:2784–2795.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, A.C. Van Steirteghem. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England).* 340:17–8.
- Palomino, W.A., P. Kohen, L. Devoto. 2010. A single midcycle dose of levonorgestrel similar to emergency contraceptive does not alter the expression of the L-selectin ligand or molecular markers of endometrial receptivity. *Fertil. Steril.* 94:1589–1594.
- Passaro, M.D., J. Piquion, N. Mullen, D. Sutherland, S. Zhai, W.D. Figg, R. Blye, L.K. Nieman. 2003. Luteal phase dose-response relationships of the antiprogesterin CDB-2914 in normally cycling women. *Hum. Reprod.*

- 18:1820–7.
- Patel, B., S. Elguero, S. Thakore, W. Dahoud, M. Bedaiwy, S. Mesiano. 2015. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum. Reprod. Update.* 21:155–173.
- Payne, C., V. Rawe, J. Ramalho-Santos, C. Simerly, G. Schatten. 2003. Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J. Cell Sci.* 116:4727–4738.
- Peitz, B., P. Olds-Clarke. 1986. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.* 35:608–17.
- Pepperell, J.R., K. Kommineni, S. Buradagunta, P.J. Smith, D.L. Keefe. 1999. Transmembrane regulation of intracellular calcium by a plasma membrane sodium/calcium exchanger in mouse ova. *Biol. Reprod.* 60:1137–43.
- Pérez-Lara, Á., A. Thapa, S.B. Nyenhuis, D.A. Nyenhuis, P. Halder, M. Tietzel, K. Tittmann, D.S. Cafiso, R. Jahn. 2016. PtdInsP2 and PtdSer cooperate to trap synaptotagmin-1 to the plasma membrane in the presence of calcium. *Elife.* 5.
- Philpott, C.C., M.J. Ringuette, J. Dean. 1987. Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev. Biol.* 121:568–75.
- Pomorski, T., J.C.M. Holthuis, A. Herrmann, G. van Meer. 2004. Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell Sci.* 117:805–813.
- Pomorski, T., A.K. Menon. 2006. Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2908–21.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. 2013. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 99:63.
- Puga Molina, L.C., G.M. Luque, P.A. Balestrini, C.I. Marín-Briggiler, A. Romarowski, M.G. Buffone. 2018. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front. Cell Dev. Biol.* 6:72.
- Qualmann, B., M.M. Kessels. 2002. Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 220:93–144.
- Qualmann, B., M.M. Kessels, R.B. Kelly. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150:F111–6.
- Que, E.L., R. Bleher, F.E. Duncan, B.Y. Kong, S.C. Gleber, S. Vogt, S. Chen, S.A. Garwin, A.R. Bayer, V.P. Dravid, T.K. Woodruff, T. V. O'Halloran. 2015. Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nat. Chem.* 7:130–139.
- Que, E.L., F.E. Duncan, A.R. Bayer, S.J. Philips, E.W. Roth, R. Bleher, S.C. Gleber, S. Vogt, T.K. Woodruff, T. V. O'Halloran. 2017. Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integr. Biol. (Camb).* 9:135–144.
- Ramathal, C., I. Bagchi, R. Taylor, M. Bagchi. 2010. Endometrial Decidualization: Of Mice and Men. *Semin. Reprod. Med.* 28:017–026.
- Ramathal, C., R.A. Reijo Pera, S.L. Chavez. 2015. Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 233–265.
- Ravaux, B., N. Garroum, E. Perez, H. Willaime, C. Gourier. 2016. A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci. Rep.* 6:31886.
- Rawe, V.Y., S.B. Olmedo, F.N. Nodar, G.D. Doncel, A.A. Acosta, A.D. Vitullo. 2000. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol. Hum. Reprod.* 6:510–6.

- Raz, T., R. Shalgi. 1998. Early events in mammalian egg activation. *Hum. Reprod.* 13 Suppl 4:133–45.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal, N. Ahmad. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22:659–661.
- Reel, J.R., S. Hild-Petito, R.P. Blye. 1998. Antiovulatory and postcoital antifertility activity of the antiprogesterin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats. *Contraception.* 58:129–36.
- Reeve, W.J., F.P. Kelly. 1983. Nuclear position in the cells of the mouse early embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 75:117–39.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A.C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, D.E. Clapham. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413:603–609.
- Roblero, L. 1973. Effect of progesterone in vivo upon the rate of cleavage of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 35:153–5.
- Roblero, L., L. Izquierdo. 1976. Effect of progesterone on the cleavage rate of mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 46:475–6.
- Roblero, L.S., O. Fernandez, H.B. Croxatto. 1987. The effect of RU486 on transport, development and implantation of mouse embryos. *Contraception.* 36:549–555.
- Rogers, N.T., E. Hobson, S. Pickering, F.A. Lai, P. Braude, K. Swann. 2004. Phospholipase C ζ causes Ca $^{2+}$ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction.* 128:697–702.
- Roller, R.J., R.A. Kinloch, B.Y. Hiraoka, S.S. Li, P.M. Wassarman. 1989. Gene expression during mammalian oogenesis and early embryogenesis: quantification of three messenger RNAs abundant in fully grown mouse oocytes. *Development.* 106:251–61.
- Rosato, E., M. Farris, C. Bastianelli. 2015. Mechanism of Action of Ulipristal Acetate for Emergency Contraception: A Systematic Review. *Front Pharmacol.* 6:315.
- Ross, P.J., Z. Beyhan, A.E. Iager, S.-Y. Yoon, C. Malcuit, K. Schellander, R.A. Fissore, J.B. Cibelli. 2008. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Dev. Biol.* 8:16.
- Rysavy, N.M., L.M.N. Shimoda, A.M. Dixon, M. Speck, A.J. Stokes, H. Turner, E.Y. Umemoto. 2014. Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture.* 4:127–37.
- Sagare-Patil, V., M. Galvankar, M. Satiya, B. Bhandari, S.K. Gupta, D. Modi. 2012. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 35:633–644.
- Sahu, S.K., S.N. Gummadi, N. Manoj, G.K. Aradhyam. 2007. Phospholipid scramblases: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 462:103–14.
- Sakkas, D., M. Ramalingam, N. Garrido, C.L.R. Barratt. 2015. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum. Reprod. Update.* 21:711–726.
- Salustri, A., L. Campagnolo, F.G. Klinger, A. Camaioni. 2018. Molecular organization and mechanical properties of the hyaluronan matrix surrounding the mammalian oocyte. *Matrix Biol.*
- SAMeR. 2015. Problemática actual de la fertilidad en la República Argentina.
- Sanders, J.R., K. Swann. 2016. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction.* 152:R41–R50.

- Saunders, C.M., M.G. Larman, J. Parrington, L.J. Cox, J. Royse, L.M. Blayney, K. Swann, F.A. Lai. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129:3533–44.
- Schafer, D.A. 2002. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:76–81.
- Schatten, G. 1994. The Centrosome and Its Mode of Inheritance: The Reduction of the Centrosome during Gametogenesis and Its Restoration during Fertilization. *Dev. Biol.* 165:299–335.
- Schatten, G., H. Schatten, I. Spector, C. Cline, N. Paweletz, C. Simerly, C. Petzelt. 1986. Latrunculin inhibits the microfilament-mediated processes during fertilization, cleavage and early development in sea urchins and mice. *Exp. Cell Res.* 166:191–208.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 9:676–82.
- Schindler, K., R.M. Schultz. 2009. The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. *Cell Cycle*. 8:1090–1098.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, E. Pinney, J. Allard. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127:1217–32.
- Seabra, S.H., W. de Souza, R.A. Damatta. 2004. Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:744–52.
- Sedgh, G., J. Bearak, S. Singh, A. Bankole, A. Popinchalk, B. Ganatra, C. Rossier, C. Gerdts, Ö. Tunçalp, B.R. Johnson, H.B. Johnston, L. Alkema. 2016. Abortion incidence between 1990 and 2014: global, regional, and subregional levels and trends. *Lancet*. 388:258–267.
- Sedgh, G., S. Singh, R. Hussain. 2014. Intended and Unintended Pregnancies Worldwide in 2012 and Recent Trends. *Stud. Fam. Plann.* 45:301–314.
- Segawa, K., S. Kurata, S. Nagata. 2016. Human Type IV P-type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium. *J. Biol. Chem.* 291:762–772.
- Sessions, A., A.F. Horwitz. 1981. Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts. *FEBS Lett.* 134:75–8.
- Sessions, A., A.F. Horwitz. 1983. Differentiation-related differences in the plasma membrane phospholipid asymmetry of myogenic and fibrogenic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 728:103–11.
- Shalgi, R., D.M. Phillips. 1980. Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol. Reprod.* 23:433–44.
- Shiina, Y., M. Kaneda, K. Matsuyama, K. Tanaka, M. Hiroi, K. Doi. 1993. Role of the extracellular Ca^{2+} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97:143–50.
- Sikorski, A.F., K. Michalak, M. Bobrowska. 1987. Interaction of spectrin with phospholipids. Quenching of spectrin intrinsic fluorescence by phospholipid suspensions. *Biochim. Biophys. Acta.* 904:55–60.
- Simons, K., J.L. Sampaio. 2011. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a004697–a004697.
- Smith, J.F., O. Syritsyna, M. Fellous, C. Serres, N. Mannowetz, Y. Kirichok, P. V. Lishko. 2013. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{2+} channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:6823–6828.

- Snow, S.E., S.N. Melillo, C.I. Jarvis. 2011. Ulipristal acetate for emergency contraception. *Ann Pharmacother.* 45:780–786.
- Sokac, A.M., W.M. Bement. 2006. Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol. Biol. Cell.* 17:1495–502.
- Sokac, A.M., C. Co, J. Taunton, W. Bement. 2003. Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in *Xenopus* eggs. *Nat. Cell Biol.* 5:727–732.
- Sokac, A.M., C. Schietroma, C.B. Gundersen, W.M. Bement. 2006. Myosin-1c Couples Assembling Actin to Membranes to Drive Compensatory Endocytosis. *Dev. Cell.* 11:629–640.
- Solum, N.O. 1999. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:2841–6.
- Spector, A.A., M.A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26:1015–35.
- Spona, J., K. Matt, W.H. Schneider. 1975. Study on the action of D-norgestrel as a postcoital contraceptive agent. *Contraception.* 11:31–43.
- Stace, C., N. Ktistakis. 2006. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1761:913–926.
- Stival, C., L. del C. Puga Molina, B. Paudel, M.G. Buffone, P.E. Visconti, D. Krapf. 2016. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 220:93–106.
- Stowell, M.H., B. Marks, P. Wigge, H.T. McMahon. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* 1:27–32.
- Stratton, P., B. Hartog, N. Hajizadeh, J. Piquion, D. Sutherland, M. Merino, Y.J. Lee, L.K. Nieman. 2000. A single mid-follicular dose of CDB-2914, a new antiprogesterin, inhibits folliculogenesis and endometrial differentiation in normally cycling women. *Hum. Reprod.* 15:1092–9.
- Stratton, P., E.D. Levens, B. Hartog, J. Piquion, Q. Wei, M. Merino, L.K. Nieman. 2010. Endometrial effects of a single early luteal dose of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914. *Fertil. Steril.* 93:2035–41.
- Strunker, T., N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, U.B. Kaupp. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature.* 471:382–386.
- Suarez, S.S. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J. Androl.* 17:331–5.
- Suarez, S.S. 2016. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 363:185–194.
- Suarez, S.S., X.B. Dai, R.P. DeMott, K. Redfern, M.A. Mirando. 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J. Androl.* 13:75–80.
- Suarez, S.S., A.A. Pacey. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Updat.* 12:23–37.
- Sun, F., A. Bahat, A. Gakamsky, E. Girsh, N. Katz, L.C. Giojalas, I. Tur-Kaspa, M. Eisenbach. 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum. Reprod.* 20:761–767.
- Sun, Q.-Y., H. Schatten. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction.* 131:193–205.
- Sutherland, A.E., T.P. Speed, P.G. Calarco. 1990. Inner cell allocation in the mouse morula: the role of oriented division during fourth cleavage. *Dev. Biol.* 137:13–25.

- Sutovsky, P., C.S. Navara, G. Schatten. 1996. Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol. Reprod.* 55:1195–205.
- Suzuki, J., D.P. Denning, E. Imanishi, H.R. Horvitz, S. Nagata. 2013. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science.* 341:403–6.
- Suzuki, J., M. Umeda, P.J. Sims, S. Nagata. 2010a. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature.* 468:834–838.
- Suzuki, T., N. Yoshida, E. Suzuki, E. Okuda, A.C.F. Perry. 2010b. Full-term mouse development by abolishing Zn²⁺-dependent metaphase II arrest without Ca²⁺ release. *Development.* 137:2659–2669.
- Swann, K. 1992. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine-sensitive calcium store. *Biochem. J.* 287 (Pt 1):79–84.
- Swann, K., C. Saunders, N. Rogers, F. Lai. 2006. PLC ζ (zeta): A sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17:264–273.
- Talbi, S., A.E. Hamilton, K.C. Vo, S. Tulac, M.T. Overgaard, C. Dosiou, N. Le Shay, C.N. Nezhat, R. Kempson, B.A. Lessey, N.R. Nayak, L.C. Giudice. 2006. Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-Ovulatory Women. *Endocrinology.* 147:1097–1121.
- Tatone, C., S. Delle Monache, R. Iorio, D. Caserta, M. Di Cola, R. Colonna. 2002. Possible role for Ca(2+) calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca(2+) signal in mouse oocyte activation. *Mol. Hum. Reprod.* 8:750–7.
- Taylor, C.T., Y.M. Lawrence, C.R. Kingsland, M.M. Biljan, K.S. Cuthbertson. 1993. Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum. Reprod.* 8:2174–9.
- Terada, Y., C. Simerly, G. Schatten. 2000. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 56:89–98.
- Teves, M.E., F. Barbano, H.A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska, L.C. Giojalas. 2006. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* 86:745–9.
- Thiele, C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz, W.B. Huttner. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2:42–49.
- Thoma, M.E., A.C. McLain, J.F. Louis, R.B. King, A.C. Trumble, R. Sundaram, G.M. Buck Louis. 2013. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil. Steril.* 99:1324–1331.e1.
- Toshimori, K., E.M. Eddy. 2015. The Spermatozoon. *Knobil Neill's Physiol. Reprod. Physiol. Reprod.* 99–148.
- Toyoda, Y., M.C. Chang. 1974. Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K-Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 36:125–34.
- Trifaró, J., S.D. Rosé, T. Lejen, A. Elzagallaai. 2000. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie.* 82:339–52.
- Tsaadon, L., R. Kaplan-Kraicer, R. Shalgi. 2008. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate, but not Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, is the mediator in cortical granules exocytosis. *Reproduction.* 135:613–24.
- Tsai, P.-S., T. van Haften, B.M. Gadella. 2011. Preparation of the cortical reaction: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. *Biol. Reprod.* 84:327–35.

- Tůmová, L., E. Chmelíková, T. Žalmanová, V. Kučerová-Chrpová, R. Romar, M. Dvořáková, K. Hošková, J. Petr. 2016. Calcineurin role in porcine oocyte activation. *Animal*. 10:1998–2007.
- Uh, K., J. Ryu, L. Zhang, J. Errington, Z. Machaty, K. Lee. 2019. Development of novel oocyte activation approaches using Zn²⁺ chelators in pigs. *Theriogenology*. 125:259–267.
- Uhler, M.L., A. Leung, S.Y. Chan, C. Wang. 1992. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 58:1191–8.
- Valansi, C., D. Moi, E. Leikina, E. Matveev, M. Graña, L. V Chernomordik, H. Romero, P.S. Aguilar, B. Podbilewicz. 2017. Arabidopsis HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens. *J. Cell Biol.* 216:571–581.
- Valentijn, K.M., F.D. Gumkowski, J.D. Jamieson. 1999. The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and membrane retrieval in pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1):81–96.
- Vanden Meerschaut, F., L. Leybaert, D. Nikiforaki, C. Qian, B. Heindryckx, P. De Sutter. 2013. Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. *Hum. Reprod.* 28:87–98.
- Vanden Meerschaut, F., D. Nikiforaki, B. Heindryckx, P. De Sutter. 2014. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod. Biomed. Online*. 28:560–571.
- Van Genderen, H.O., H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, C.P.M. Reutelingsperger. 2008. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim. Biophys. Acta*. 1783:953–63.
- Van Meer, G., D.R. Voelker, G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112–124.
- Versieren, K., B. Heindryckx, S. Lierman, J. Gerris, P. De Sutter. 2010. Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. *Reprod. Biomed. Online*. 21:769–75.
- Vigil, P., R.F. Orellana, M.E. Cortés. 2011. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biol. Res.* 44:151–9.
- Vincent, C., T.R. Cheek, M.H. Johnson. 1992. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 2):389–96.
- Visconti, P.E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:667–668.
- Visconti, P.E., J.L. Bailey, G.D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, G.S. Kopf. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121:1129–37.
- Visconti, P.E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltrán, J.J. Acevedo, A. Darszon. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 13:395–405.
- Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, G.S. Kopf. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121:1139–50.
- Von Kleist, L., W. Stahlschmidt, H. Bulut, K. Gromova, D. Puchkov, M.J. Robertson, K.A. MacGregor, N. Tomilin, N. Tomlin, A. Pechstein, N. Chau, M. Chircop, J. Sakoff, J.P. von Kries, W. Saenger, H.-G. Kräusslich, O. Shupliakov, P.J. Robinson, A. McCluskey, V. Haucke. 2011. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*. 146:471–84.
- Wachten, D., J.F. Jikeli, U.B. Kaupp. 2017. Sperm Sensory Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*

9:a028225.

- Wakai, T., N. Zhang, P. Vangheluwe, R.A. Fissore. 2013. Regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} oscillations in mammalian eggs. *J. Cell Sci.* 126:5714–5724.
- Wanderley, J.L.M., M.E.C. Moreira, A. Benjamin, A.C. Bonomo, M.A. Barcinski. 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J. Immunol.* 176:1834–9.
- Wang, H.-X., T. V. Kolesnikova, C. Denison, S.P. Gygi, M.E. Hemler. 2011. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J. Cell Sci.* 124:2702–2710.
- Wang, H., S.K. Dey. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 7:185–199.
- Wang, L., Y.-H. Zhen, X.-M. Liu, J. Cao, Y.-L. Wang, L.-J. Huo. 2017. Inhibition of calcineurin by FK506 stimulates germinal vesicle breakdown of mouse oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *PeerJ.* 5:e3032.
- Wangren, K., A. Stavreus-Evers, C. Olsson, E. Andersson, K. Gemzell-Danielsson. 2008. Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. *Hum Reprod.* 23:2359–2368.
- Wassarman, P.M. 1988. Zona Pellucida Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57:415–442.
- Wassarman, P.M., E.S. Litscher. 2001. Towards the Molecular Basis of Sperm and Egg Interaction during Mammalian Fertilization. *Cells Tissues Organs.* 168:36–45.
- Webb, M., S.K. Howlett, B. Maro. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 95:131–45.
- Whalley, T., M. Terasaki, M.S. Cho, S.S. Vogel. 1995. Direct membrane retrieval into large vesicles after exocytosis in sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 131:1183–92.
- Whitaker, L.H.R., A.A. Murray, R. Matthews, G. Shaw, A.R.W. Williams, P.T.K. Saunders, H.O.D. Critchley. 2017. Selective progesterone receptor modulator (SPRM) ulipristal acetate (UPA) and its effects on the human endometrium. *Hum. Reprod.* 32:531–543.
- Whitten, W.K. 1957. The effect of progesterone on the development of mouse eggs in vitro. *J. Endocrinol.* 16:80–5.
- Williams, A.R.W., C. Bergeron, D.H. Barlow, A. Ferenczy. 2012. Endometrial Morphology After Treatment of Uterine Fibroids With the Selective Progesterone Receptor Modulator, Ulipristal Acetate. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 31:556–569.
- Winston, N., M. Johnson, S. Pickering, P. Braude. 1991. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil. Steril.* 56:904–12.
- Wira, C.R., M. Rodriguez-Garcia, M. V Patel. 2015. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat. Rev. Immunol.* 15:217–30.
- Wortzman-Show, G.B., M. Kurokawa, R.A. Fissore, J.P. Evans. 2007. Calcium and sperm components in the establishment of the membrane block to polyspermy: studies of ICSI and activation with sperm factor. *Mol. Hum. Reprod.* 13:557–65.
- Wright, G.J., E. Bianchi. 2016. The challenges involved in elucidating the molecular basis of sperm–egg recognition in mammals and approaches to overcome them. *Cell Tissue Res.* 363:227–235.
- Wu, L.-G., E. Hamid, W. Shin, H.-C. Chiang. 2014a. Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 76:301–331.

- Wu, X.-S., B.D. McNeil, J. Xu, J. Fan, L. Xue, E. Melicoff, R. Adachi, L. Bai, L.-G. Wu. 2009. Ca²⁺ and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat. Neurosci.* 12:1003–1010.
- Wu, X.-S., Z. Zhang, W.-D. Zhao, D. Wang, F. Luo, L.-G. Wu. 2014b. Calcineurin Is Universally Involved in Vesicle Endocytosis at Neuronal and Nonneuronal Secretory Cells. *Cell Rep.* 7:982–988.
- Yanagida, K., Y. Fujikura, H. Katayose. 2008. The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reprod. Med. Biol.* 7:133–142.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. *Physiol. Reprod.* 189–317.
- Yanagimachi, R., A. Bhattacharyya. 1988. Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J. Exp. Zool.* 248:354–360.
- Yanagimachi, R., M.C. Chang. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature.* 200:281–2.
- Yang, Y., M. Lee, G.D. Fairn. 2018. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.* 293:6230–6240.
- Yang, Y.Q., J.T. Wu. 1990. RU 486 interferes with egg transport and retards the in vivo and in vitro development of mouse embryos. *Contraception.* 41:551–6.
- Yeste, M., C. Jones, S.N. Amdani, S. Patel, K. Coward. 2016. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Hum. Reprod. Update.* 22:23–47.
- Yeung, T., G.E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, S. Grinstein. 2008. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science.* 319:210–3.
- Yeung, T., B. Heit, J.-F. Dubuisson, G.D. Fairn, B. Chiu, R. Inman, A. Kapus, M. Swanson, S. Grinstein. 2009. Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J. Cell Biol.* 185:917–28.
- Yokoo, M., E. Sato. 2004. Cumulus–Oocyte Complex Interactions During Oocyte Maturation. *Int. Rev. Cytol.* 235:251–291.
- Yoon, S.-Y., T. Jellerette, A.M. Salicioni, H.C. Lee, M. Yoo, K. Coward, J. Parrington, D. Grow, J.B. Cibelli, P.E. Visconti, J. Mager, R.A. Fissore. 2008. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.* 118:3671–3681.
- Yu, Y., R. Dumollard, A. Rossbach, F.A. Lai, K. Swann. 2010. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J. Cell. Physiol.* 224:672–680.
- Yu, Y., G. Halet, F.A. Lai, K. Swann. 2008. Regulation of diacylglycerol production and protein kinase C stimulation during sperm- and PLC ζ -mediated mouse egg activation. *Biol. Cell.* 100:633–643.
- Yu, Y., M. Nomikos, M. Theodoridou, G. Nounesis, F.A. Lai, K. Swann. 2012. PLC ζ causes Ca(2+) oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P(2). *Mol. Biol. Cell.* 23:371–80.
- Zamboni, L. 1972. Fertilization in the mouse. *Biol. Mamm. Fertil. Implant.* 213–62.
- Zegers-Hochschild, F., G.D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. van der Poel, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organization. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum. Reprod.* 24:2683–2687.
- Zhang, C., B.D. Murphy. 2014. Progesterone is critical for the development of mouse embryos. *Endocrine.* 46:615–623.
- Zhang, D., L. Pan, L.-H. Yang, X.-K. He, X.-Y. Huang, F.-Z. Sun. 2005. Strontium promotes calcium oscillations

- in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Hum. Reprod.* 20:3053–3061.
- Zhang, R., C. Zhang, Q. Zhao, D. Li. 2013. Spectrin: Structure, function and disease. *Sci. China Life Sci.* 56:1076–1085.
- Zhao, J., Q. Zhou, T. Wiedmer, P.J. Sims. 1998. Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273:6603–6.
- Zhou, Q., P.J. Sims, T. Wiedmer. 1998. Identity of a Conserved Motif in Phospholipid Scramblase That Is Required for Ca^{2+} -Accelerated Transbilayer Movement of Membrane Phospholipids[†]. *Biochemistry.* 37:2356–2360.
- Zhu, X.-L., S.-T. Qi, J. Liu, L. Chen, C. Zhang, S.-W. Yang, Y.-C. Ouyang, Y. Hou, H. Schatten, Y.-L. Song, F.-Q. Xing, Q.-Y. Sun. 2012. Synaptotagmin1 is required for spindle stability and metaphase-to-anaphase transition in mouse oocytes. *Cell Cycle.* 11:818–826.
- Zhuo, L., K. Kimata. 2001. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct. Funct.* 26:189–96.
- Zumoffen, C., M.D. Gómez-Elías, A.M. Caille, L. Bahamondes, P.S. Cuasnicú, D.J. Cohen, M.J. Munuce. 2017. Study of the effect of ulipristal acetate on human sperm ability to interact with tubal tissue and cumulus-oocyte-complexes. *Contraception.* 95:586–591.

FE DE ERRATAS

- En las Figuras 1.3 a 1.9, donde se indica que la mayoría de los ovocitos presentan un determinado patrón de marcación, esto corresponde a un porcentaje mayor al 90% en todos los casos.
- En la página 86, dentro la Figura 1.17.b donde dice “DNA” debe decir “Hoechst 33342” y donde dice “CG” debe decir “LCA”.